

**Koagulations- und Fibrin(ogen)olyseparameter
während und nach kardio-pulmonaler Reanimation**

Christoph-Hinrich Bushe



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0083

Aus der Medizinischen Klinik III im Klinikum Großhadern
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. Wilmanns

Koagulations- und Fibrin(ogen)olyseparameter
während und nach kardiopulmonaler Reanimation

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph-Hinrich Bushe
aus
Würzburg
Jahr
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. W. Brendel
2. Prof. Dr. K. Peter

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. W. Klaubert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3.2.1987

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
2. Physiologische Grundlagen der Gerinnung und Fibrinolyse	3
3. Material und Methoden	10
3.1. Patienten	11
3.2. Untersuchungsmaterial	14
3.3. Untersuchungsmethoden	14
3.3.1. Laser-Nephelometrie	14
3.3.1.1. Bestimmung von Fibronektin	17
3.3.1.2. Bestimmung von Prothrombin	17
3.3.1.3. Bestimmung von Plasminogen	18
3.3.1.4. Bestimmung von α 2-Makroglobulin	18
3.3.2. Staphylokokken-Clumping-Test	18
3.3.3. Bestimmung von Fibrinogen	18
3.3.4. Fibrinopeptid A RIA-Test	19
3.3.5. F-CB3 RIA-Test	19
3.3.6. DD-Bestimmung	19
3.3.7. funktionelle AT III Bestimmung	20
3.3.8. Die SDS-Gel-Elektrophorese	21
4. Ergebnisse	26
4.1.1. Patient 1	26
4.1.2. Patient 2	34
4.1.3. Patient 3	41
4.1.4. Patient 4	44
4.1.5. Patient 5	48
4.1.6. Patient 6	50
4.2. Ergebniszusammenfassung	52
5. Diskussion	55
6. Zusammenfassung	58
7. Literatur	60

1. Einleitung

Erste Versuche zur Wiederbelebung sind schon im Mittelalter beschrieben worden (2,35). Die erste erfolgreiche Herzmassage am offenen Herzen wurde 1901 von Ingelsrud mitgeteilt (51). In den 50iger Jahren dieses Jahrhunderts führte die Einführung der künstlichen Beatmung zu umrissenen Reanimationskonzepten, die auch außerhalb des Krankenhauses Anwendung fanden (46). Durch die zusätzliche Herzmassage, 1960 von Kouwenhoven eingeführt (38), konnten die Reanimationsergebnisse deutlich verbessert werden (58,59). Ein standardisiertes Vorgehen nach festen Regeln (ABC) ermöglichte die Schulung und Einbeziehung von Laien in das Reanimationskonzept (40).

Ziel der kardiopulmonalen Reanimation ist es, neben der Beatmung, durch die Herzmassage eine ausreichende Minimalperfusion der Mikrozirkulation wiederherzustellen, um irreversible Zellschädigungen, insbesondere des Zerebrums vorzubeugen.

Neben dem prä- und postkapillären Sphinktertonus und der Integrität des Gefäßendothels wird die Mikrozirkulation durch die innere Reibung des Blutes (Blutviskosität) entscheidend beeinflusst (23). Im Rahmen der kardiopulmonalen Reanimation spielt die Blutviskosität somit eine wichtige Rolle. Sie setzt sich aus der Struktur- und der Plasmaviskosität zusammen.

Die Strukturviskosität nimmt mit dem Hämatokrit, der Rigidität der Erythrozytenmembran und der Bildung von Erythrozytenaggregaten (Geldrollen) zu (54). Die Praestase kann über Plasmaabstrom in das Gewebe, Hämatokrit-Erhöhung und Geldrollenbildung schließlich zum völligen Sistieren der Mikrozirkulation führen (25).

Praestase und Stase begünstigen aber auch hypoxische Endothelschäden und die Aktivierung der Gerinnung (43). Dadurch kann die Blutfluidität weiter abnehmen und die Perfusion zusätzlich erschwert werden. Schließlich kann die Bildung von Thromben zur irreversiblen Verlegung der Endstrombahn führen (44,54). Intermediärprodukte der Gerinnung und der Fibrinolyse können zusätzlich die Clearance-Funktion des RES beeinträchtigen

sowie den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität beeinflussen (13,57,62).

Mikroembolisationen mit Multiorganversagen werden durch eine Erschöpfung des RES begünstigt (56). Die Prognose des Schocks hängt deshalb wesentlich von der Clearance-Funktion des RES ab (37), für die ausreichende Plasma-Fibronektin-Spiegel eine entscheidende Voraussetzung sind (56).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb zu untersuchen, welche Hämostaseveränderungen während und nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation beobachtet werden können und welche Bedeutung ihnen zukommen. Daneben sollen die Fibronektin-Spiegel untersucht werden.

2. Physiologische Grundlagen der Gerinnung und Fibrinolyse

Die Hämostase wird durch das ausgewogene Nebeneinander von Gerinnung und Fibrinolyse aufrechterhalten.

Die Gerinnung gewährleistet die Integrität der Gefäßwände von Makro- und Mikrozirkulation durch die Bildung von Gerinnseln an defekten Stellen. Daran sind eine zelluläre und eine plasmatische Komponente beteiligt. Den zellulären Teil stellen die Thrombozyten dar, die sich bei Verletzung eines Gefäßes an den freigelegten Kollagenfasern anlagern und Thrombozytenaggregate bilden. Diese setzen Serotonin frei, das über Katecholamine eine Vasokonstriktion an dem Gefäßdefekt bewirkt. Dieser Mechanismus zum ersten Wundverschluß wird primäre Hämostase genannt.

Gleichzeitig wird der plasmatische Teil der Gerinnung aktiviert. Über viele Zwischenreaktionen führt dieser in seiner Endreaktion zur Umwandlung des Plasmaproteins Fibrinogen in Fibrin und seine hochmolekularen Oligomere. Diese Fibrinderivate organisieren den primären Thrombus, indem sie ein Gitterwerk zwischen den Thrombozyten und damit eine Leitschiene für die bindewebige Deckung des Defektes bilden. Die Durchsetzung des Thrombus mit Fibrin wird als sekundäre Hämostase bezeichnet.

Durch die Fibrinolyse werden nach Deckung der Gefäßwanddefekte die Fibrinanteile des Gerinnsels wieder aufgelöst.

Beide Systeme, plasmatische Gerinnung und Fibrinolyse sind Aktivierungskaskaden, an denen Aktivatoren und Inhibitoren teil haben. Die oben beschriebenen Vorgänge der Gerinnung und Fibrinolyse laufen nicht nur bei traumatischer Schädigung der Gefäßgewebe ab. Auslösender Mechanismus der Gerinnung können auch eine anoxische Schädigung des Gefäßendothels, eine Freisetzung von bioaktiven Aminen oder eine Stase des Blutes in der Mikrozirkulation sein.

Klinische Beispiele hierfür sind die Thrombose, Lungenembolie und die disseminierte intravasale Gerinnung (53).

Fibrinogenmolekül

Fibrinogen ist ein Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 340 kilo-Daltons (kd), das in den Mikrosomen der Leberparenchymzellen synthetisiert wird. Es wandert in der Plasmaelektrophorese zwischen der α_2 - und der β -Fraktion.

Seine biologische Halbwertszeit ist zwischen 2 und 4 Tagen bestimmt worden. Das Fibrinogenmolekül ist ein aus jeweils 3 Untereinheiten aufgebautes Dimer. Die Untereinheiten jedes Dimerteiles stellen die drei Polypeptidketten α , β und γ dar. Die α -Kette und die β -Kette enthalten am N-terminalen Ende kurze Polypeptidsequenzen, das FPA und FPB, die durch Thrombin abgespalten werden können. Deshalb bezeichnet man die Ketten als $A\alpha$, $B\beta$, und γ (Abb. 1).

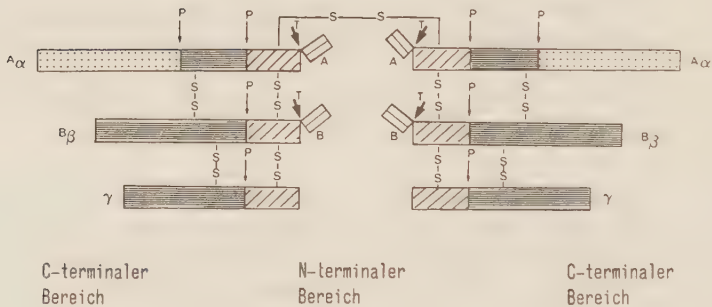


Abb. 1: Modell des Fibrinogenmoleküls mit den $A\alpha$ -, $B\beta$ - und γ -Ketten.

T = Thrombinspaltstelle, P = Plasminspaltstelle

A = FPA, B = FPB

▨ = E-Domäne, ▤ = D-Domäne

Die Aminosäuresequenz der Polypeptidketten wurde aufgeschlüsselt (31, 32). Die Kenntnis der Stellung von Cystein in der Aminosäuresequenz der einzelnen Ketten läßt Rückschlüsse auf die Ausbildung von Disulfidbrücken im Fibrinmolekül zu (29,30). Insgesamt gibt es 29 Disulfidbrücken im Molekül, die in mehreren Molekülbereichen konzentriert sind. Zwei im Zentrum des Fibrinogenmoleküls gelegene Knoten mit einer Häufung von Disulfidbrücken lassen hier im N-terminalen Bereich beider Dimerteile eine besonders stabile Domäne, die E-Domäne entstehen. Zwei weitere Knotenstrukturen liegen an den aus dem zentralen Molekülbereich herausragenden Dimerteilen im Bereich der D-Domänen (Abb. 1).

Über zwei verschiedene Wege, das Extrinsic und Intrinsic System kann aus Prothrombin Thrombin aktiviert werden. Thrombin ist das proteolytische Enzym, das die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin katalysiert.

Die Aktivierung von Prothrombin geschieht über eine Kaskade von hintereinander ablaufenden Umsetzungen von einem Proaktivator in einen Aktivator. Dabei hat die Kaskade eine Verstärkerfunktion. Jeder aktivierte Proaktivator katalysiert auf der nächsten Stufe der Kaskade die Umsetzung von mehreren Proaktivatoren, so daß am Ort der Verletzung ein großes thromboplastisches Potential freigesetzt wird.

Extrinsic System:

Zur Aktivierung von Thrombin wird aus dem verletzten Gewebe ein Gewebefaktor freigesetzt, der über zwei weitere zwischengeschaltete Faktoren Prothrombin aktiviert.

Das Intrinsic System:

Das Intrinsic System läuft langsamer ab als das Extrinsic System. Dabei wird ein im Blut zirkulierender Profaktor, der sogenannte Hageman Faktor (XII), durch Kontakt mit Kollagen aktiviert. Über vier weitere Aktivatorstufen aktiviert er ebenfalls Prothrombin. In diese Aktivierungskaskade kann ein Plättchenfaktor 3, der von Thrombozyten freigesetzt wird, aktivierend mit eingreifen.

Thrombin ist eine hochspezifische Serinprotease, die Arginyl-Glycin Bindungen spezifisch spaltet. Bei der Umwandlung von Fibrinogen in

Fibrin werden durch Thrombin von einem Mol Fibrinogen zwei Mole eines aus 16 Aminosäuren bestehenden Polypeptides, mit einem Molekulargewicht von 1500 Daltons (d) von der α -Kette abgespalten. Diese Peptide werden als Fibrinopeptid A (FPA) bezeichnet (5). Das FPA besitzt im Organismus eine kurze Halbwertszeit von etwa 3 Minuten. Die FPA-Konzentration im Serum ist daher ein wichtiger Parameter für die Thrombinaktivität. Aus dem Fibrinogen entsteht durch die Abspaltung des FPA ein im Plasma lösliches Fibrinmonomer. Die Abspaltung bewirkt eine Konformationsänderung des Fibrinmoleküls derart, daß mehrere dieser Monomere sich in einer End-zu-End- oder Seit-zu-Seit-Lage durch nicht-kovalente Bindungen zusammenlagern können (7). Diese Komplexe sind in Urea löslich (18).

In einem weiteren Schritt kann Thrombin von der B β -Kette ein weiteres Polypeptid, bestehend aus 14 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 1500 d, abspalten. Dieses Polypeptid heißt Fibrinopeptid B (FPB).

Thrombin aktiviert gleichzeitig Faktor XIII, eine Transglutaminase zu Faktor XIIIa. Dieser führt in Anwesenheit von Calciumionen zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen γ -Ketten benachbarter Fibrinmonomere sowie im weiteren Verlauf zur Quervernetzung von α -Ketten. Im Unterschied zu in 5-molarer Urea löslichen Fibrinmonomeren ist das quervernetzte Fibrin nicht mehr löslich.

Ein wirksamer Inhibitor der Gerinnung ist das Antithrombin III (AT III). Es hemmt Thrombin, in geringem Maß auch die anderen Serinproteasen des Intrinsic und Extrinsic Systems und damit die limitierte Proteolyse des Fibrinogens (4). Therapeutisch gegebenes Heparin, als Kofaktor von Antithrombin III, kann die Affinität von Antithrombin III zu Thrombin um ein Vielfaches erhöhen.

Die Wiederauflösung hochmolekularer, quervernetzter Fibrinpolymere erfolgt durch das fibrinolytische System. Es wird aktiviert, wenn Gewebs- oder Plasmaaktivatoren die Umsetzung von Plasminogen in Plasmin aktivieren (64).

Neben quervernetztem Fibrin kann auch Fibrinogen durch Plasmin abgebaut werden. Diese Fibrinogenolyse wird aber physiologischerweise durch die

Inhibitoren α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin verhindert. In vitro oder unter pathologischen Bedingungen greift Plasmin das Fibrinogenmolekül an definierten Stellen zwischen den Disulfidknoten an, so daß charakteristische Abbauprodukte entstehen.

Die dabei entstehenden typischen Bruchstücke werden aus Anteilen mehrerer Ketten gebildet, die dabei durch die Disulfidbrücken stabilisiert sind.

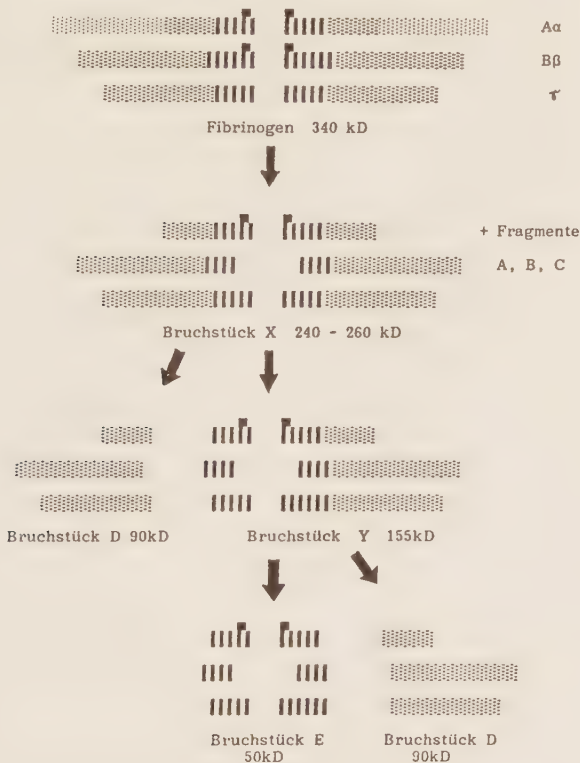


Abb. 2: Plasmininduzierte Fibrinogenolyse

Der primäre Abbauschritt der plasmininduzierten Fibrinogenolyse liegt am C-terminalen Ende der A α -Kette, da diese aus dem Molekül herausragt und dem Plasmin leicht zugänglich ist. Deshalb kann beim Gesunden neben dem Fibrinogen mit dem Molekulargewicht 340 kd auch ein Fibrinogen von 320 kd und 300 kd beobachtet werden. Beim weiteren Abbau kommt es zu einem Fibrinogen mit einem Molekulargewicht von 240 kd (41). Dieses Bruchstück wird als X bezeichnet.

Teile der α -Kettenbruchstücke können mit Hilfe eines RIA-Testes als F-CB3 verwandtes Antigen quantitativ erfaßt werden. F-CB3 ist somit ein guter Parameter für abgelaufene Plasminaktivität (14,15).

Beim weiteren Abbau des Fibrinogenmoleküls werden die D-Domänen nacheinander abgespalten. Dabei entsteht zuerst das Fibrinabbauprodukt Y, welches noch aus einer E-Domäne und einer D-Domäne besteht. Nach der Abspaltung der zweiten D-Domäne bleibt zuletzt das Fragment E übrig (Abb. 2).

Quervernetztes Fibrin wird von Plasmin zu hochmolekularen Fibrinabbauprodukten abgebaut (Abb. 3). Die Spaltstellen sind in denselben Molekülbereichen gelegen wie beim Fibrinogenmolekül. Aufgrund der Quervernetzungen entstehen quervernetzte Bruchstücke wie das Endabbau-Bruchstück DD. Weitere solche charakteristische Bruchstücke der Fibrinolyse sind z.B. das DY und die X-Oligomere (10,11,12,16,17,42).

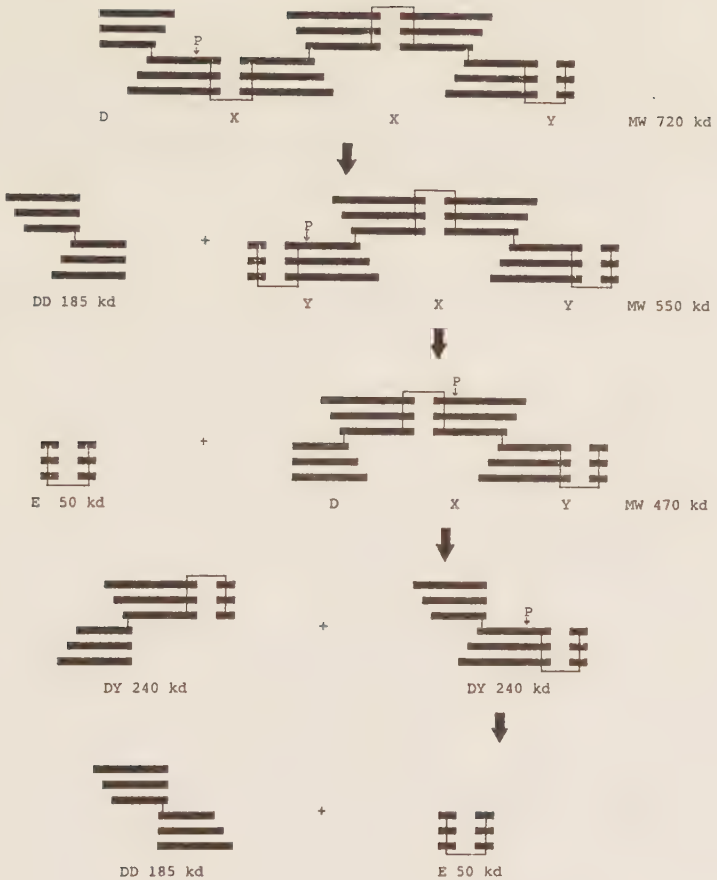


Abb. 3: Plasmininduzierte Fibrinolyse. Dargestellt ist das hochmolekulare Fibrinderivat DXXY mit dem Molekulargewicht (MW) 720 kD. Der Abbau führt zur Bildung von drei Bruchstücken DD (185 kD) und von drei Bruchstücken E (50 kD).

3. Material und Methoden

Bei 6 Patienten wurden während der kardio-pulmonalen Reanimation Blutproben entnommen. Drei Patienten, die überlebten wurden auch im weiteren Verlauf untersucht. Ursachen für die Reanimation waren bei vier Patienten ein primär kardiales Versagen (3x Myokardinfarkt, 1 x Herzrhythmusstörung). Zwei Patienten boten das Bild einer fulminanten Lungenembolie. Nähere Angaben zu den Patienten sind der Tabelle 1 und den Ausführungen zu den einzelnen Patienten zu entnehmen.

Patient	Alter	Grunderkrankung	Intervall bis zum Reanimationsbeginn	Reanimation erfolgreich
Pat. 1: M.F.	55 J.	Hypertonie Lungenembolie bei Subclaviathrombose	<5 min	ja
Pat. 2: R.K.	78 J.	KHK, Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkt	<2 min	ja
Pat. 3: H.E.	73 J.	KHK, rez. Kammer-tachykardie, Kammerflimmern	<2 min	ja
Pat. 4: F.A.	76 J.	Myokardinfarkt, Reinfarkt mit Rhythmusstörungen	<2 min	nein
Pat. 5: R.K.	74 J.	Myokardinfarkt mit Rhythmusstörungen	<2 min	nein
Pat. 6: B.M.	74 J.	Lungenembolie	<5 min	nein

Tab. 1: Patientendaten, Grunderkrankung, Intervall bis zum Reanimationsbeginn und Erfolg der Reanimation

3.1. Patienten

Patient 1:

5 Tage nach Operation eines Aneurysmas der Arteria communicans anterior kam es bei der 55-jährigen Patientin plötzlich zu einem Herz-Kreislauf-Stillstand. Innerhalb weniger Minuten wurde mit kardio-pulmonaler Reanimation begonnen. Die Reanimationsbemühungen hatten Erfolg. Im Laufe der nächsten Stunden jedoch verschlechterte sich der Zustand der Patientin trotz Gabe von Katecholaminen. 9 Stunden nach zunächst erfolgreicher Reanimation verstarb die Patientin. Die Sektion ergab Myokardeinblutungen als Folge der Reanimation, eine periphere Lungenembolie mit Quelle aus der linken V. subclavia und Schocknieren.

Patient 2:

Der 78-jährige Patient klagte mehrere Stunden nach einer komplikationslosen Operation im HNO-Bereich über Atemnot und präcordiale Schmerzen. Kurz darauf kam es zum Herzstillstand. Sofortige Beatmung und Herzmassage führten innerhalb von zwei Minuten zum Wiedereinsetzen der Herz-tätigkeit.

Der Patient wurde sodann intubiert und auf die Intensivstation verlegt. Anamnestisch war eine koronare Herzkrankheit mit Ventrikelextrasystolen bekannt.

Als weitergehende Therapie mußte der sinkende Blutdruck mit hohen Dosen an Katecholaminen gestützt werden.

Der Blutdruck des Patienten stieg auf 100/60 mmHg im Laufe der Nacht an. Der Patient wurde wach, Pupillenreaktion war normal. Spontanatmung setzte ein. Im weiteren Verlauf von 18 Tagen wurde der Patient wiederum ateminsuffizient, es bildete sich das klinische Bild einer Schocklunge aus. Der Patient verstarb 18 Tage nach der Reanimation an Herz-Kreislauf- und Lungenversagen. Eine Sektion wurde abgelehnt.

Patient 3:

Der 73-jährigen Patientin mit Diabetes mellitus wurde in der Chirurgischen Klinik wegen einer Großzehengangrän die Großzehe amputiert. Im postoperativen Verlauf von zwei Monaten kam es wiederholt zu schweren Herzrhythmusstörungen mit Kammertachykardie und Kammerflimmern. Bei der untersuchten Reanimation zwei Monate postoperativ mußte sie wegen erneutem Kammerflimmern reanimiert werden. Carotis- und Femoralispulse waren nicht mehr tastbar. Da die Patientin auf der Intensivstation überwacht wurde, konnte sofort mit Reanimationsversuchen begonnen werden. Es wurde mehrmals defibrilliert und eine externe Herzmassage durchgeführt. Ein kurz nach der Reanimation geschriebenes EEG zeigte ein pathologisches Kurvenbild mit einer schweren Allgemeinveränderung. Einen Monat nach dieser Reanimation verstarb die Patientin.

Patient 4:

Bei der 76-jährigen Patientin war eine koronare Herzerkrankung mit bereits einem abgelaufenem Herzinfarkt bekannt. Nachdem sie eine Woche über zunehmende präkordiale Schmerzen geklagt hatte, kam es zum Reinfarkt mit stärksten retrosternalen Schmerzen, Orthopnoe, Zyanose, Blutdruckabfall und schließlich zum Herzstillstand. Die Reanimation mit Intubation, Katecholamingaben und mehrfacher Defibrillation mußte nach einer Stunde erfolglos abgebrochen werden.

Patient 5:

Bei dem 74-jährigen Patienten lag eine generalisierte Gefäßsklerose mit bereits zwei abgelaufenen Zerebralinsulten vor. Die Klinikaufnahme erfolgte wegen zunehmender pektangioßer Beschwerden. Im zunächst, bis auf einen bekannten Rechtsschenkelblock, unauffälligen EKG traten zunehmend AV-Blockierungen auf. Deshalb wurde ein passagerer Herzschrittmacher gelegt. Trotzdem kam es zum Blutdruckabfall mit elektromechanischer Entkoppelung. Während der Reanimation konnte nur kurzzeitig eine Koppelung erreicht werden. Trotz hochdosierter Katecholamingaben und 100%iger Sauerstoffgabe blieb die Reanimation erfolglos.

Patient 6:

Der 74-jährige Patient wurde wegen eines Hypopharynx-Karzinoms operiert. 15 Tage postoperativ kam es in der Nacht zu Kammertachykardie mit Blutdruckabfall. Weiterhin klagte der Patient über einen thorakalen Schmerz. Am Morgen wurde er plötzlich bewußtlos. Der Blutdruck war nicht mehr meßbar. Es wurde eine Reanimation mit Beatmung und Herzmassage begonnen. Es konnte jedoch keinerlei eigene Herzaktion ausgelöst werden.

3.2. Untersuchungsmaterial

Die Blutabnahme erfolgte aus zentralvenösen Zugängen, die bei Reanimationsbeginn gelegt worden waren, unter Vermeidung von Verdünnungsfaktoren in vorbereitete Spritzen. Verwendet wurde ein spezielles Antikoagulum nach Graeff in einer Verdünnung 1:9. Es enthält 0,13 mol/l Natriumcitrat, 0,06 mol/l TES, 0,05 mol/l EDTA, 2000 KIU/ml Aprotinin (Trasylol Bayer) und ist auf einen pH von 7,4 eingestellt. Die Zusammensetzung des Antikoagulum inhibiert sowohl koagulatorische, wie auch fibrinolytische Aktivitäten in den entnommenen Proben. Außerdem wurde auch Citratblut abgenommen, das für funktionelle Tests verwandt wurde. Nach der Entnahme wurde das Blut zentrifugiert und das überstehende Plasma abgehoben. Entsprechend portioniert wurde es bei -40°C bis -80°C eingefroren. Zu den Bestimmungen wurden die Proben schnell im Wasserbad auf 34°C aufgewärmt.

3.3. Untersuchungsmethoden

Quantitativ nachgewiesen wurden:

Fibrinogen, Fibrinopeptid A (FPA), F-CB3, DD, Prothrombin, Plasminogen, Antithrombin III, α 2-Makroglobulin und Fibronektin. Fibrin(ogen)bruchstücke wurden semiquantitativ mit einem Staphylokokken-Clumping-Test nachgewiesen.

Zur Darstellung der Fibrin(ogen)abbauprodukte und der Fibronektinbruchstücke wurden zusätzlich SDS-PAGE-Disc-Elektrophoresen durchgeführt.

3.3.1. Laser-Nephelometrie (LN)

Die Laser-Nephelometrie ist eine Methode zur raschen quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen mittels einer Antikörper-Antigen-Komplexbildung (19,63). Die Grundlagen dieses Verfahrens beruhen auf, bereits vor 40 Jahren von Heidelberger und Kendall durchgeführten Untersuchungen über die Antigen-Antikörper-Konzentrationen (26,27,28). Verdünntes Plasma wird mit einem, für das Plasmaprotein spezifischen Antikörperserum versetzt. Die im Laufe der Antikörper-Antigen-Komplexbildung auftretende Trübung wird im Strahlengang eines Laser-Nephelometers als Streuung des

Laserlichtes elektronisch registriert. Die Intensität des Streulichtsignals ist abhängig von der Konzentration und der Größe der sich bildenden Antigen-Antikörper-Komplexe. Untersucht man die Streulichtintensität bei konstanter Antikörperkonzentration in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration, so ergibt sich eine Heidelberger Kurve (Abb. 4).

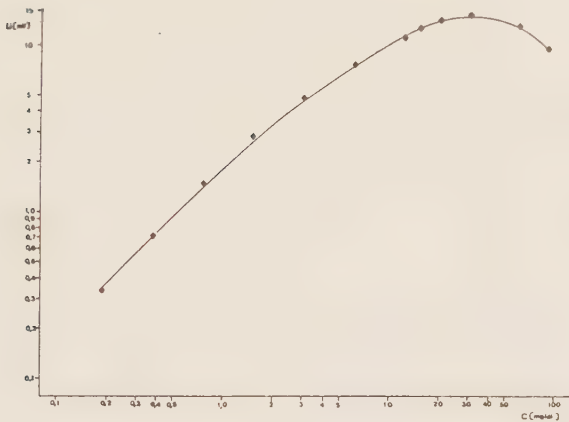


Abb. 4: Heidelberger Kurve einer Antigen-Antikörper-Reaktion

Im aufsteigenden linken Teil der Kurve liegt ein Antikörperüberschuß vor. Seine höchste Intensität erreicht das Streulicht am Äquivalenzpunkt. Steigt die Antigenkonzentration weiter an, so wird der Antigenüberschuß erreicht. Das Netzwerk aus Antigen-Antikörper-Komplexen bricht zusammen und das Streulichtsignal nimmt wieder ab. Der Meßbereich für das zu untersuchende Protein muß im aufsteigenden linken Teil der Heidelberger Kurve liegen. Dies wird durch entsprechende Vorverdünungen der Proben erreicht.

Das Patientenplasma wird vor der Untersuchung von Lipiden geklärt, um Streulicht zu verhindern. Sodann wird es verdünnt und mit dem Antiserum versetzt. Die Kinetik der Reaktion ist in Abbildung 5 dargestellt. Nach 15 Minuten wird ein Gleichgewicht erreicht, das sich bis zu 60 Minuten noch leicht verändert. Das Streulichtsignal wird an einer Photoelektrode als Spannung in Millivolt registriert.

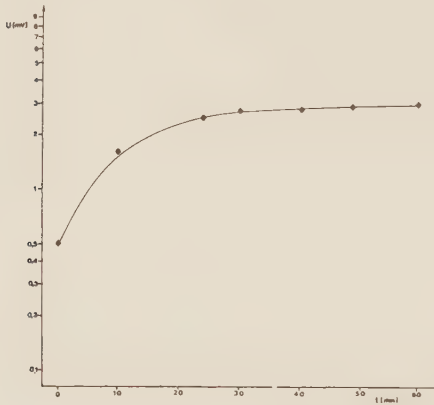


Abb. 5: Kinetik der Reaktion eines Fibronektin-Antikörpers mit einem Normalplasma

Die Auswertung des Meßsignals erfolgt über eine Eichkurve, die zuvor erstellt wird:

Von einem Standardplasma wird mit physiologischer NaCl-Lösung eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:2,5 - 1:640). Diese Verdünnungen werden mit einem Antiserum, das 1:5 verdünnt ist, versetzt. Zu 100 µl Standardplasma verdünnung werden 200 µl Antiserum verdünnung direkt in eine spezielle Lasernephelometrie-Küvette gegeben. Hier läuft die Reaktion ab. Nach 50 Minuten wird das Streulicht gemessen. Mittels der Streulicht-Werte der Verdünnungen und ihren Konzentrationen kann eine Eichkurve erstellt werden.

Es wurde ein Laser-Nephelometer der Fa. Behring verwandt. Die Auswertung erfolgte über einen Rechner der Fa. Hewlett-Packard, dem die Werte der Eichkurven eingegeben wurden.

Im Laufe der Messungen wurde die Meßgenauigkeit mittels Kontrollplasmen aus einem selbst angelegten Plasmapool überprüft.

3.3.1.1. Bestimmung von Fibronektin

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung gab es von der Fa. Behring noch keine Arbeitsvorschrift für die Bestimmung von Fibronektin. Um den optimalen Meßbereich im aufsteigenden Teil der Heidelberger Kurve zu finden, wurden in Anlehnung an Pott (52) in mehreren Meßreihen unterschiedliche Verdünnungen von Antikörper und Antigen untersucht. Hierbei war es wichtig den Meßbereich der Eichkurve so zu legen, daß er bei entsprechender Verdünnung des Plasmas die Fibronektinkonzentrationen von 5 mg/dl - 60 mg/dl erfaßt. Eine Verdünnungsreihe von 100 mg/dl bis zu 0,1 mg/dl Fibronektin wurde erstellt. Dann wurden 100 µl dieser Verdünnungen jeweils mit 200 µl eines 1:5 verdünnten Antiserums (Clotimmun Behring Fibronektin) versetzt. Nach 50 Minuten Reaktionszeit wurde das Streulicht gemessen. Die Streulichtintensität in Abhängigkeit von der Konzentration wurde auf einer doppellogarithmischen Kurve aufgetragen (Abb. 4). Als Referenz wurden die Verdünnungen auf Partigenplatten für Fibronektin aufgetragen und dort die Konzentrationen gemessen.

Für weitere Meßungen wurde der aufsteigende Schenkel der Heidelberger Kurve im Bereich zwischen 0,5 bis 10 mg/dl gewählt. Deshalb wurden die Proben 1:10 vorverdünnt, so daß Proben von 5 - 100 mg/dl Fibronektin ausgemessen werden konnten.

Der an einem gesunden Kollektiv gemessene Normalwert liegt zwischen 20 und 40 mg/dl (34).

3.3.1.2. Bestimmung von Prothrombin

Es wurde ein käuflicher LN-Antikörper der Firma Behring verwandt. Plasmaverdünnung 1:10, Antikörperverdünnung 1:5, Plasmavolumen 100µl,

Antiserum 200 µl, Reaktionszeit 50 Minuten. Der Meßbereich erfaßt Werte von 2,5 bis 40 mg/dl. Der Normalwert liegt bei 5-10 mg/dl.

3.3.1.3. Bestimmung von Plasminogen

Es wurde ein LN-Antikörper von Firma Behring verwandt. Die Plasmaverdünnung war 1:10, Antikörperversüßung 1:5, Plasmavolumen 100 µl, Antiserum 200 µl, Reaktionszeit 50 Minuten. Der Meßbereich liegt bei 1,6 bis 52 mg/dl. Die Normalwerte liegen zwischen 6 und 25 mg/dl.

3.3.1.4. Bestimmung von α 2-Makroglobulin

Es wurde ein käuflicher LN-Antikörper der Firma Behring verwandt. Plasmaverdünnung 1:10, Antiserumverdünnung 1:5, Plasmaprobevolumen 100 µl, Antiserumvolumen 200 µl, Reaktionszeit 50 Minuten. Der Meßbereich umfaßt Werte von 25 bis 800 mg/dl. Die Normalwerte liegen zwischen 150 und 420 mg/dl.

3.3.2. Staphylokokken-Clumping-Test

Bei dem Staphylokokken-Clumping-Test werden die Fibrin(ogen)spaltprodukte (FSP) semiquantitativ bestimmt. Für die Bestimmungen wurde ein Testsatz der Firma Behring verwandt. Staphylokokken tragen auf ihrer Oberfläche sogenannte "Clumping Factors". Wird zu einer Suspension von Staphylokokken Serum mit den FSP gegeben, so kommt es zu einer sichtbaren Verklumpung, ausgelöst durch die Brückenbildung der Spaltprodukte. Es muß die entsprechende Titerstufe gesucht werden. Der Clumping-Faktor erfaßt neben den Fibrin(ogen)bruchstücken X und Y auch Fibrinogen (24). Daher müssen die FSP aus dem Serum, das durch Ausgerinnung (s.3.3.3) gewonnen wird, bestimmt werden.

3.3.3. Bestimmung von Fibrinogen

Fibrinogen wurde nach einer von Hafter und Graeff beschriebenen modifizierten Methode nach Blombäck (20) als gerinnbares Protein bestimmt. Dabei wird mittels Test-Thrombin Fibrinogen aus dem Plasma gefällt. Zur Vermeidung einer Fibrinolyse wird Aprotinin zugegeben. Das entstandene

Gerinnsel wird isoliert, mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in 5 molarer Urea in 20%iger NaCl-Lösung aufgelöst. Die Extinktion wird bei 280 nm und die unspezifische Extinktion bei 325 nm gegen Urea gemessen. Die Berechnung erfolgt nach Hoermann und Gollwitzer gemäß folgender Formel (33):

$$\text{mg gerinnbares Protein/dl} = (E_{280} - E_{325}) \times 691,8$$

Der Faktor 691,8 errechnete sich aus dem Extinktionskoeffizienten für Fibrinogen in Alkali von 15,87 und einem Korrekturfaktor zur Kompensation der Verdünnung durch das verwandte Antikoagulanz.

Das bei der Fibrinogenbestimmung mittels Thrombinfällung gewonnene Serum wird zur Bestimmung des F-CB3 und der Fibrin(ogen)spaltprodukte verwandt.

3.3.4. Fibrinopeptid A RIA-Test

Zum Nachweis von Fibrinopeptid A wurde ein von Nossel (47,48) entwickelter RIA-Test der Fa. BYK-Mallinkrodt verwandt. Bei diesem Test wird Serum aus der, mit Antikoagulanz gewonnenen Plasmaprobe durch Absorption von Fibrinogen an Bentonite gewonnen (36). Das so gewonnene Serum wird dann im RIA-Test untersucht. Der Normalbereich, gemessen an einem gesunden Kollektiv lag in unserem Labor unter 5 pmol/ml.

3.3.5. F-CB3 RIA-Test

F-CB3 wurde nach der Methode von Gollwitzer mit einem RIA-Test nachgewiesen (14,15). Der erste Antikörper für diesen RIA-Test wurde von Frau Dr. Gollwitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie München-Martinsried zur Verfügung gestellt. Der Nachweis von F-CB3 erfolgt im Serum, um Kreuzreaktionen mit Fibrinogen zu vermeiden. Die Normalwerte liegen bei einem gesunden Kollektiv unter 20 pmol/ml.

3.3.6. DD-Bestimmung

DD wurde mit einem ELISA-Test bestimmt. Als erster Antikörper wurde ein Antikörper gegen DD der Fa. MAbCO Australien verwandt. Durchgeführt wurde der Test auf einer 96-Loch Mikrotiter-Platte (Dynatech Immulon Cat

No. 655061) in einer zwei-Wege Sandwich-Technik nach EIA Protokoll (MABCO) unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers und eines zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Als Substrat wurde O-Toluidin-Di-hydrochlorid (Sigma T 6269) benutzt. Normalwerte für DD im Plasma liegen unter 300 ng/ml (21).

3.3.7. Funktionelle AT III Bestimmung

Verwandt wurde der Test Berichrom AT III von Fa. Behring. Dabei wird in den Proben vorgelegtes AT III durch Heparin aktiviert, so daß es im Testansatz vorgelegtes Thrombin inaktiviert. Der übrigbleibende Thrombingehalt wird in einem kinetischen Test bestimmt. Dazu wird ein chromogenes Substrat verwandt. Das Reaktionsschema lautet:

AT III-Probe + Thrombin-Überschuß $\longrightarrow$ (AT III-Thrombin) + Thrombin-Rest

Thrombin-Rest

HD-CHA-But-Arg-pNA $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ HD-CHA-But-Arg-OH + p-Nitroanilin

3.3.8. Die SDS-Gel-Elektrophorese

Fibrin(ogen) und seine Abbauprodukte sowie Fibronektin und seine Abbauprodukte wurde auf SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresen nach Weber und Osborn (65) aufgetragen. Als Elektrophoresekammer standen Vertikalelektrophoresekammern der Fa. Bio-Rad und der Fa. LKB zur Verfügung.

Probenvorbereitung:

Zur Isolierung der Fibrin(ogen)produkte wurde eine Protaminsulfatfällung durchgeführt und zusätzlich, zum Nachweis der Spezifität, wurde Fibrin(ogen)material mittels Sepharose gebundenen Antikörpers isoliert.

Protaminsulfatfällung:

Es wird eine 0,1%ige Lösung von Protaminsulfat hergestellt. Sodann wird zu 5 ml der verdünnten 10%igen Plasmaprobe in der Kälte 0,5 ml der Protaminsulfatlösung gegeben. Es soll zu einer langsamen Ausfällung des Fibrin(ogens) kommen, da nur so Fibrinogen und seine Spaltprodukte genügend angereichert werden. Andernfalls werden Albumin und Immunglobuline mit ausgefällt. Bei ausreichender weißer Trübung wird in der Kälte der Niederschlag abzentrifugiert. Sodann wird mit 1%iger Ammoniumsulfatlösung gewaschen und schließlich der Niederschlag in 8 M Urea aufgelöst.

Affinitätschromatographie:

Fibrinogen Antikörper (Fa. Behring) wurden gemäß Firmenvorschrift (pharmacia) kovalent an Bromcyanaktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt. 0,5 ml Plasma wurden mit 5 ml 0,9%iger NaCl und 0,5 ml Sepharose-AK-Gel versetzt und 30 min lang kopfüber rotiert. Anschließend wurde zentrifugiert und das Gel zweimal mit 0,9%iger NaCl gewaschen. Das an den Sepharose-AK gebundene Fibrinogenmaterial wurde mit 0,4 ml 2%iger SDS-Lösung in 8 M Harnstoff aus der Ag-AK Bindung freigesetzt. Das Sepharosegel wurde abzentrifugiert, der Überstand als Probe aufgetragen.

Zur Isolation von Fibronektin wurde Gelatine-Sepharose 4B der Fa. Pharmacia verwendet und in entsprechender Weise vorgegangen.

Reduzierung:

Zur Darstellung der Fibrinogenkettenuntereinheiten wurden ein Teil der gefällten Proben mit Mercaptoäthanol reduziert.

Herstellung der Gele:

Zur Auftrennung des nicht reduzierten Fibrinogen- und Fibronektinmaterials wurden 3,5%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Dazu wurde hochgereinigtes Acrylamid der Firma Bio-Rad mit einem Quervernetzer DATO zu Polyacrylamid vernetzt. Als Starter der Polymerisation wurde Ammoniumpersulfat und TEMED benutzt. Als Gelpuffer diente ein Phosphatpuffer 0,2 M ph 7,2. Nach einigen Stunden auspolymerisieren wurden die Gele mit den in 8 M Urea gelösten Proben beschickt. Laufpuffer war ein 0,1 M Phosphatpuffer ph 7,2. Es wurde eine Spannung von 200 mV und eine Stromstärke von 30 mA angelegt.

Zum Nachweis der reduzierten Fibrinogenkettenuntereinheiten wurden 8%ige Gele gegossen. Hier bestand das Polyacrylamidgel aus Acrylamid und als Quervernetzer Methylenbisacrylamid. Die Elektrophorese lief bei gleicher Spannung und Stromstärke.

Isoliertes Fibronektin wurde auf 3,5%ige Gele aufgetragen.

Zur Markierung der Pufferfront wurde Bromphenolblau mit den Proben aufgetragen.

Nach Abschluß des Elektrophoreselaufes wurden die Gele in einer 20%igen Methanollösung in 5%iger Perchlorsäure für 30 Minuten fixiert. Sodann folgte die Färbung mit einer 8%igen Chrommassie blue G Lösung. Entfärbt wurde in 7%iger Essigsäure mit 20% Methanolgehalt. Anschließend wurde das Gel getrocknet. Zur Auswertung wurde das Gel gescant und die Gele fotografiert. Zum besseren Nachweis sehr schwacher Banden wurden einige Gele anschließend mit der Silverstaining-Methode nachgefärbt. Zur Identifikation der Banden liefen auf allen Gelen eine Fibrinogenreferenz, eine Referenz mit hochmolekularen X-Oligomeren (HMW-Referenz) und Fibrinabbauprodukten und eine Fibronektinreferenz mit.

Mit Hilfe der bekannten Molekulargewichte der Referenzbanden können auch

die Molekulargewichte der unbekannten Proteine bestimmt werden. Dabei wird folgendermaßen vorgegangen:

Senkrecht zur Grundlinie des Scans werden Geraden durch die Scanspitzen gelegt. An mindestens drei Geraden, bei denen das Molekulargewicht der zu den Scanspitzen gehörigen Proteinen bekannt ist, wird in logarithmischem Maßstab das Molekulargewicht angetragen. Sodann wird eine Linie durch diese Punkte gelegt, die der Eichgerade entspricht. Bei unbekannten Banden, kann am Schnittpunkt der Geraden durch die Scanspitze mit der Eichgeraden anhand der logarithmischen Skala das Molekulargewicht des Proteins der Bande ablesen werden.

Fibrinogen-Referenz:

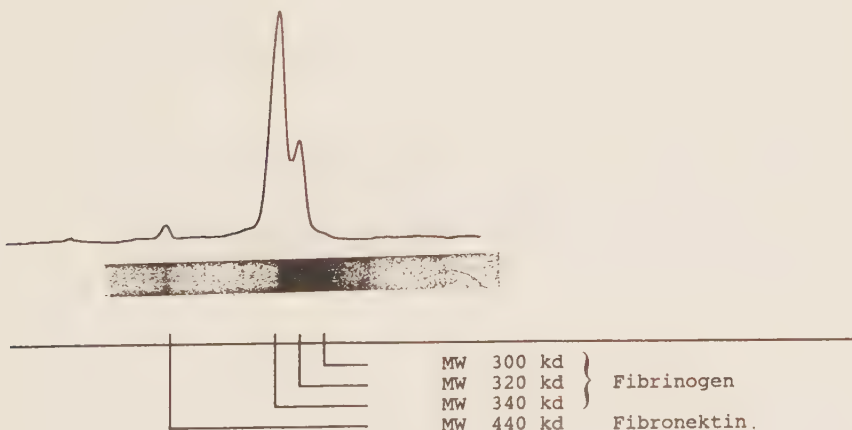


Abb. 6: Fibrinogen Referenz

Es kommen die Banden von intaktem Fibrinogen (340 kd) und leicht abgebautem Fibrinogen (320 kd) und (300 kd) zur Darstellung.

Bandenmuster der X-Oligomere und Fibrin(ogen)abbauprodukte:

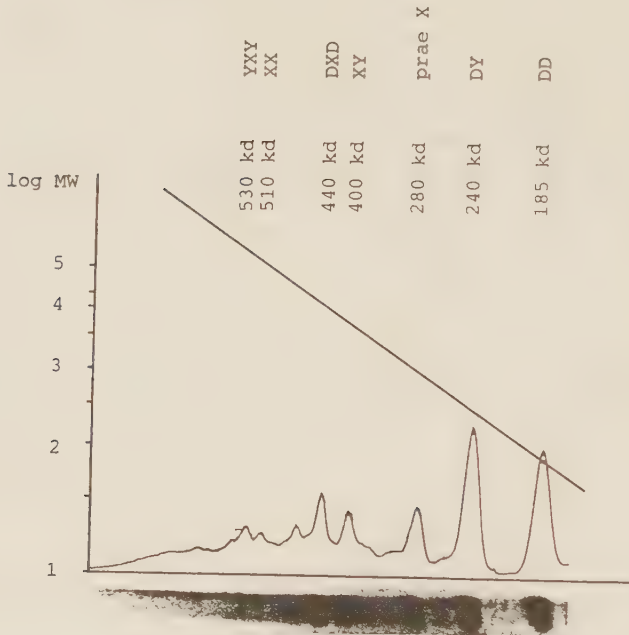


Abb. 7: Elektrophorese und Scan der X-Oligomere und der Fibrin(ogen)abbauprodukte

Hergestellt wurde die HMW-Referenz durch Inkubation von Fibrinogen (Fibrinogen-Kabi) mit Thrombin und Streptokinase. Mit Trasylol wurde die Fibrinolyse gestoppt.

Bei dieser Referenz waren die Banden für DY (240 kD) und DD (185 kD) besonders markant und bei der Festlegung der Molekulargewichte hilfreich.

Bandenmuster für reduzierte Proben:

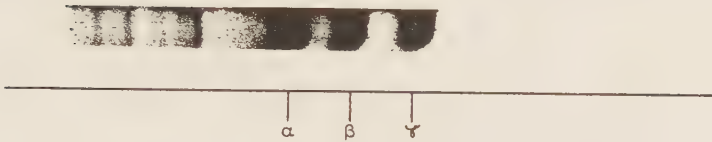


Abb. 8: Elektrophorese von reduziertem Fibrinogen

Fibrinogen wurde mit Mercaptoäthanol reduziert. Es stellen sich die α -, β - und γ -Kette des Fibrinogens dar.



Abb. 9: Elektrophorese vom reduzierten quervernetzten Fibrinmaterial

Hochmolekulare Fibrinderivate wurden reduziert. Dabei bleiben die Querverbindungen des Fibrinogens zwischen den γ -Ketten erhalten, so daß dimere γ - γ -Ketten zur Darstellung kommen.

4. Ergebnisse

4.1.1. Patient 1

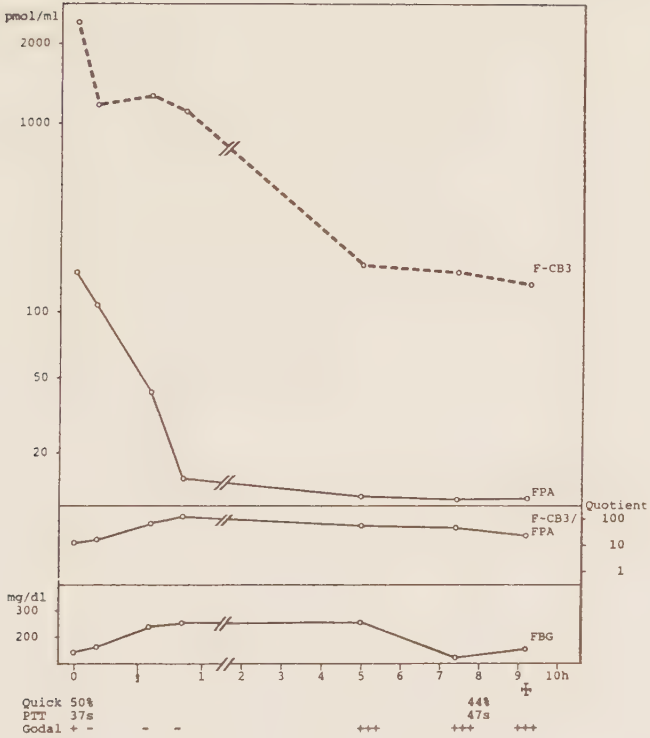
Der Verlauf für FPA, F-CB3, F-CB3/FPA Quotient, Fibrinogen, Quick-Wert, PTT und Thrombozytenzahl ist in Tabelle 2 und Abbildung 10 dargestellt.

	Zeit nach Reanimationsbeginn						
	0 min	10 min	35 min	50 min	5h	7h 20min	9h 15min
Fibrinopeptida (FPA) (< 5 pmol/ml)	234	109	41	11	7	6	7
F-CB3 (< 20 pmol/ml)	2460	1256	1288	1090	288	246	192
Quotient F-CB3 / FPA	10,5	11,5	31	99	41	41	27
FSP (< 5,0 µg/ml)	1,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Antithrombin (AT III) (22-39 mg/dl)	34,6	35,0	30,3	32,9	27,9	22,4	20,4
Fibrinogen (FBG) (200-400mg/dl)	175	190	228	232	222	128	175
Prothrombin (5-10 mg/dl)	8,2	8,2	7,0	6,9	6,1	4,6	4,6
Plasminogen (6-25 mg/dl)	10,9	10,3	10,1	10,5	9,2	6,2	5,5
α2-Makro- globulin (150-350mg/dl)	56,9	58,8	83,7	69,3	61,3	186,5	337,2
Fibronektin (25-40 mg/dl)	18,5	10,4	13,0	15,6	9,7	6,3	5,9

Normalwerte sind in Klammern angegeben

Tab. 2: Proteinkonzentrationen während und nach erfolgreicher Reanimation von Patient 1 (M.F., geb. 1.1.27)

Bei diesem Patienten fallen die, mit 234 pmol/ml initial hohen FPA-Werte innerhalb der ersten Stunde bis auf 11 pmol/ml ab. Die F-CB3-Werte sind



Patient 2 (M.F. #1.1.27) erfolgreiche Reanimation am. 26.4.82

Abb. 10: F-CB3, FPA und Fibrinogen sowie der Quotient der molaren Konzentration F-CB3/FPA während und nach erfolgreicher Reanimation bei Patient 1

zu Beginn mit 2460 pmol/ml stark erhöht, fallen langsam ab und erreichen nach 35 Minuten 1288 pmol/ml. Auch nach 9 Stunden ist das F-CB3 noch auf 192 pmol/ml erhöht. Entsprechend der sehr viel höheren molaren Konzen-

tration von F-CB3 gegenüber der von FPA ergibt sich ein hoher F-CB3/FPA Quotient mit Werten zwischen 10 und 99.

Die Fibrinogenkonzentration zeigt im Verlauf keine wesentlichen Konzentrationsänderungen. Der Godaltest ist zu Beginn der Reanimation einfach positiv, wird während der Reanimation negativ und 5 Stunden nach der Reanimation dreifach positiv. Der Quick-Wert ist bereits zu Beginn der Reanimation auf 50% erniedrigt, die PTT beträgt 37 Sekunden.

8 Stunden nach Reanimationsbeginn fällt der Quick-Wert weiter auf 44% ab und die PTT ist auf 47 Sekunden verlängert. Die FSP-Werte zeigen im Gegensatz zum F-CB3 keine Schwankungen im Verlauf. Die AT III-Aktivität ist während des gesamten Verlaufes normal. 9 Stunden nach der Reanimation fällt die AT III-Aktivität auf 20,4 mg/dl und damit geringfügig unter den Normalbereich ab. Prothrombin und Plasminogen fallen auf die Hälfte des Ausgangsniveaus ab, bleiben aber im Normalbereich.

α_2 -Makroglobulin ist initial mit 56,9 mg/dl deutlich erniedrigt, zeigt in den folgenden 5 Stunden keine wesentliche Änderung und steigt 7 Stunden nach Reanimationsbeginn auf 186,5 mg/dl und 9 Stunden nach Reanimationsbeginn auf 337,2 mg/dl an.

Fibronektin, das initial mit 18,5 mg/dl geringfügig erniedrigt ist, fällt während der Reanimation auf 13 mg/dl und im weiteren Verlauf auf 5,9 mg/dl ab. Die Scans der elektrophoretischen Auftrennung des Fibronektinmaterials, die aus einer Plasmaprobe zu Beginn der Reanimation (Abb. 11, A) und aus einer Plasmaprobe 9 Stunden nach Reanimation (Abb. 11, B) mittels Gelatine-Sepharose isoliert wurden, zeigen zu Beginn der Reanimation nur einen geringen Anteil von intaktem Fibronektin (440 kd) gegenüber den Abbauprodukten mit den Molekulargewichten (MW) 280 kd, 160 kd und 80 kd. Bei der Bande mit dem MW 340 kd handelt es sich um eine Fibrinogenverunreinigung. Bezogen auf den im Plasma gemessenen Absolutwert von 18,5 mg/dl bedeutet dies, bei einem relativen Anteil von 30 % Fibronektin am Gesamtmaterial, daß in Wirklichkeit nur 5,7 mg/dl intaktes Fibronektin (440 kd) im Plasma vorhanden sind. Entsprechend dem hohen relativen Anteil von 70% der Fibronektin-Abbauprodukte mit den Molekulargewichten 280 kd, 160 kd und 80 kd beträgt die Menge dieser Abbau-

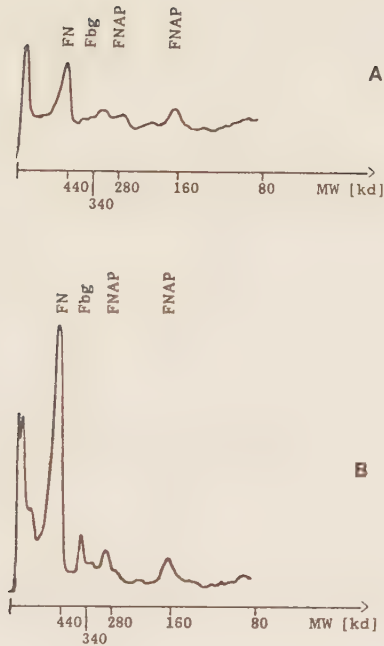


Abb. 11 : Scans der SDS-PAGE von Fibronektinmaterial (A) zu Beginn und (B) 8 Stunden nach erfolgreicher Reanimation
FN=Fibronektin, FNAP=Fibronektinabbauprodukte, FBG=Fibrinogen

produkte 11,8 mg/dl im Plasma.

9 Stunden nach Reanimation überwiegt der Anteil an intaktem Fibronektin mit 80% über den Anteil der Fibronektin-Abbauprodukte mit 20%. Bei einer gemessenen Fibronektinkonzentration von 5,9 mg/dl im Plasma ergibt sich daraus ein Anteil von 4,8 mg/dl für intaktes Fibronektin sowie von 1,1 mg/dl für die Fibronektinabbauprodukte.

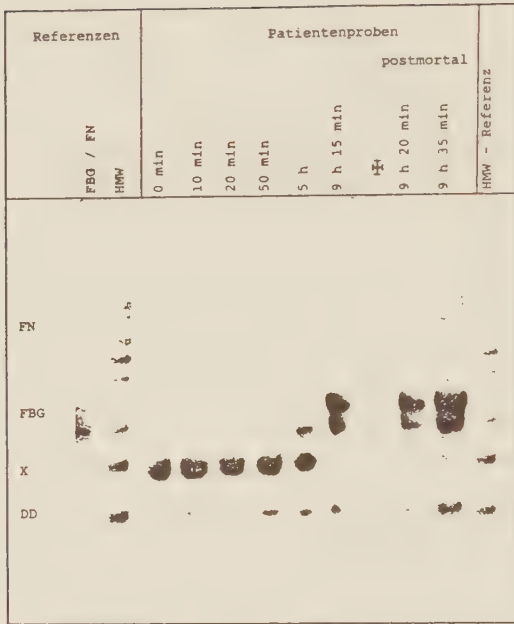


Abb. 12: SDS-PAGE von Fibrin(ogen)material vom Patienten 1 während und nach erfolgreicher Reanimation
FN=Fibronektin, FBG=Fibrinogen

Die elektrophoretische Auftrennung des mit Protaminsulfat gefällten Fibrinogenmaterials ist in Abbildung 12 und die dazugehörigen Scans in Abbildung 13 wiedergegeben. Die Molekulargewichte der Banden konnten mit Hilfe der Referenzen bestimmt werden. Zu Reanimationsbeginn läßt sich nur eine diskrete Bande mit einem Molekulargewicht (MW) von 340 kd (intaktes Fibrinogen) erkennen. Im Verlauf der folgenden 5 Stunden verschwindet diese Bande vollständig. Die mit Abstand dominierende Bande hat ein MW von 240 kd. Sie entspricht somit entweder X (MW 240 kd) oder

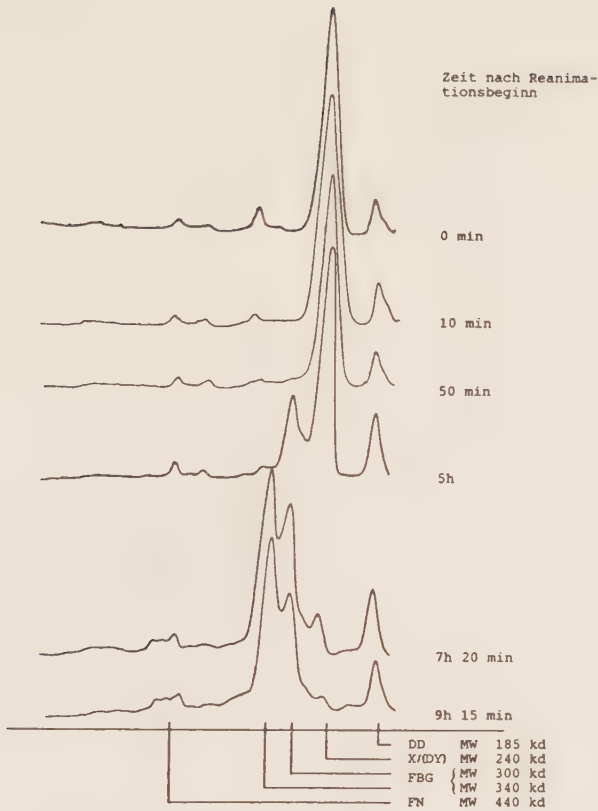


Abb. 13: Scans der SDS-PAGE von Fibrin(ogen)material des Patienten 1 während und nach erfolgreicher Reanimation

DY (MW 240 kd). Die Intensität dieser Bande nimmt 5 Stunden nach Reanimationsbeginn kontinuierlich ab und kommt dann nach 9 Stunden nur noch angedeutet zur Darstellung. Dafür kommen zuerst im Bereich 300 kd und dann im Bereich von 340 kd zwei sehr intensive Banden zur Darstellung. Diese entsprechen leicht abgebautem und intaktem Fibrinogen. Im gesamten Verlauf läßt sich eine schwache Bande mit einem Molekulargewicht von

185 kd nachweisen, die DD entspricht.

Daneben findet sich im hochmolekularen Bereich eine Bande, bei der es sich, aufgrund des mit der Fibronektinreferenz identischen Laufverhaltens, um Fibronektin handeln müßte. Andeutungsweise lassen sich praefinial und besonders im postmortalen Verlauf neben dem Fibronektin weitere hochmolekulare Banden mit einem MW zwischen 440 kd und 500 kd nachweisen, die eine weitgehende Übereinstimmung im elektrophoretischen Wanderverhalten mit den Banden der HMW-Referenz erkennen lassen.



Abb. 14: SDS-PAGE von Fibrin(ogen)material vom Patienten 1, während und nach erfolgreicher Reanimation, das im Gegensatz zu den übrigen Elektrophoresen mit Fibrinogen-Antikörper isoliert wurde

Das mit Hilfe der Affinitätschromatographie an Sepharose-Fibrinogen-Antikörper isolierte Fibrin(ogen)material zeigt zu den Zeitpunkten 0, 50 Minuten und 9 Stunden 15 Minuten nach Beginn der Reanimation ein im molekularen Bereich unter 340 kd mit den protaminsulfatgefällten Proben

identisches Bandenmuster (Abb. 14). Der fehlende Nachweis der Fibronektinbande bestätigt die hohe Spezifität der Methode.

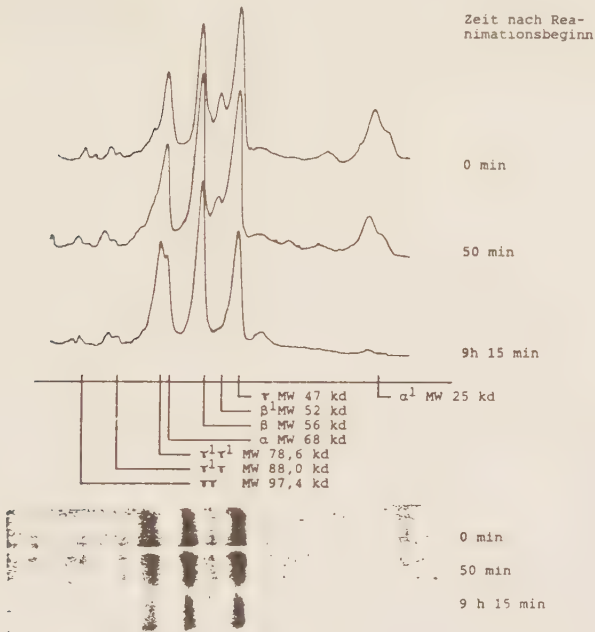


Abb. 15: Scans der SDS-PAGE von reduziertem Fibrin(ogen)material des Patienten 1 während und nach erfolgreicher Reanimation

Im reduzierten Material (Abb. 15) lassen sich die Kettenuntereinheiten α (69kd), β (56kd) und γ (47,5 kd) nachweisen, wobei der Anteil der α -Kette verglichen mit der β -Kette, bzw. der γ -Kette bei Reanimationsbeginn und 50 Minuten danach vermindert ist. Daneben findet sich ein initial ausgeprägter, später abnehmender Anteil an α^1 -Kettenbruchstück (MW 25 kd). Neben diesen Kettenuntereinheiten lassen sich in abnehmender Menge β^1 - und β^2 -Ketten nachweisen. Außerdem findet sich ein geringer Anteil dimerer γ -Ketten (γ - γ , γ^1 - γ , γ^1 - γ^1).

4.1.2. Patient 2

Wie aus Tabelle 3 und Abbildung 16 zu ersehen ist, fällt Fibrinopeptid A während der Reanimation von 78 pmol/ml auf 57 pmol/ml ab. 3,5 Stunden nach Reanimationsbeginn kommt es vorübergehend zu einem FPA-Anstieg mit einem Maximalwert von 276 pmol/ml. 14 Stunden nach Reanimationsbeginn ist der FPA-Spiegel auf 18 pmol/ml gefallen.

	Zeit nach Reanimationsbeginn					
	0 min	55 min	2h 40min	3h 25min	5h 40min	14h
Fibrinopeptid A (FPA) (< 5 pmol/ml)	78	57	169	276	138	18
F-CB3 (< 20 pmol/ml)	584	182	340	562	387	104
Quotient F-CB3 / FPA	7,5	3,2	2,0	2,0	2,8	5,7
FSP (< 5 µg/ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
DD (< 300 ng/dl)	1165	1020	735	580	715	580
Antithrombin (AT III) (22-38 mg/dl)	16,1	16,8	14,6	12,5	11,6	14,9
Fibrinogen (FBG) (200-400mg/dl)	444	410	367	337	329	318
Prothrombin (5-10 mg/dl)	7,3	7,3	6,5	5,7	5,8	5,7
Plasminogen (6-25 mg/dl)	10,1	9,9	9,4	6,9	8,3	7,3
α_2 -Makroglobulin (150-350mg/dl)	196	190	148	129	123	139
Fibrinogenktin (25-40 mg/dl)	28,7	23,0	24,1	15,3	15,2	21,5

Normalwerte sind in Klammern angegeben

Tab. 3: Proteinkonzentrationen während und nach erfolgreicher Reanimation von Patient 2 (R.K., geb. 20.03.04)

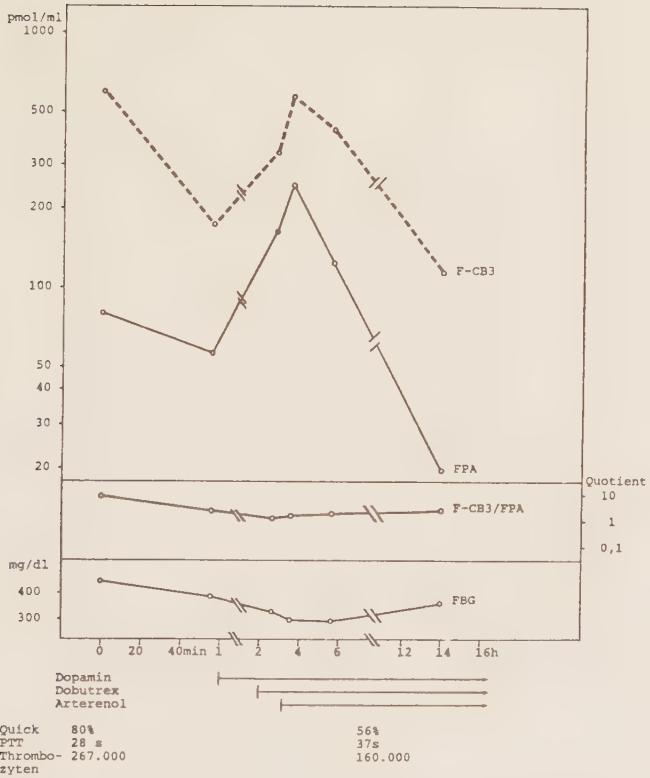


Abb. 16: F-CB3, FPA und Fibrinogen sowie der Quotient der molaren Konzentration F-CB3/FPA während und nach erfolgreicher Reanimation von Patient 2

Die F-CB3 Werte sind initial mit 584 mol/ml stark erhöht, steigen, nach einem kurzfristigen Abfall auf 182 pmol/ml, im weiteren Verlauf nach 3,5 Stunden auf einen Maximalwert von 562 pmol/ml erneut an und fallen dann wieder auf 104 pmol/ml ab. Der Quotient der molaren Konzentration von F-CB3/FPA ist immer größer als 1. Fibrinogen fällt im gesamten Beobachtungszeitraum kontinuierlich von 440 mg/dl bis auf 318 mg/dl ab.

Unmittelbar vor Eintreten der Reanimationssituation beträgt der Quick-Wert 80%, die PTT 28 Sekunden und die Thrombozytenzahl 267.000/ml. 8 Stunden nach Reanimation ist der Quick-Wert auf 56% abgefallen, die PTT auf 37 Sekunden angestiegen und die Thrombozytenzahl auf 160.000 gesunken. Der Zeitpunkt der Gabe von Dopamin, Dobutrex und Arterenol ist zusätzlich aus Abbildung 16 zu ersehen. Die Anstiege von FPA und F-CB3 fallen mit dem Beginn der Katecholamininfusionen zusammen.

Die Fibrin(ogen)spaltprodukte liegen im gesamten Verlauf mit 1,5 µg/ml im Normalbereich und zeigen keine Schwankungen. DD ist initial mit 1165 ng/ml auf das vierfache der Norm erhöht, fällt zum Ende der Reanimation auf 1020 ng/ml und im weiteren Verlauf auf 580 ng/ml ab. Die AT III-Werte sind bereits initial mit 16,1 mg/dl erniedrigt, fallen 6 Stunden nach Reanimationsbeginn bis auf 11,6 mg/dl ab und steigen nach weiteren 8 Stunden wieder auf 14,9 mg/dl an. Prothrombin und Plasminogen zeigen eine leicht abnehmende Tendenz, bleiben aber im Normalbereich. α 2-Makroglobulin fällt erst 3 Stunden nach Reanimationsbeginn geringfügig unter den Normalbereich ab, erreicht nach 5 Stunden mit 123 mg/dl seinen tiefsten Wert und zeigt dann nach 14 Stunden mit 139 mg/dl eine wiederanstiegende Tendenz.

Fibronektin erreicht bei einem Ausgangswert von 29,7 mg/dl nach 5,5 Stunden seinen tiefsten Wert mit 15,2 mg/dl und steigt nach weiteren 8 Stunden wieder auf 21,5 mg/dl an. Aus der Plasmaprobe 55 Minuten nach Reanimationsbeginn wurde Fibronektin isoliert. Der Scan der elektrophoretischen Auftrennung ist in Abbildung 17 wiedergegeben. Neben einer Bande mit dem MW 440 kd, die intaktem Fibronektin entspricht, lassen sich eine Reihe von Abbauprodukten mit den Molekulargewichten 300 kd, 280 kd, 200 kd, 160 kd, 120 kd und 80 kd darstellen.

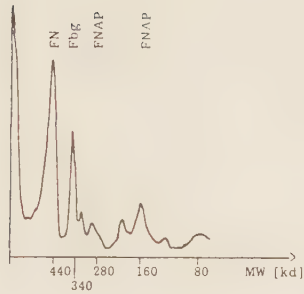


Abb. 17: SDS-PAGE von Fibronectinmaterial 8 Stunden nach erfolgreicher Reanimation von Patient 2

FN=Fibronectin, FNAP=Fibronectinabbauprodukte, FBG=Fibrinogen

Die Bande mit dem Molekulargewicht 340 kd konnte als Fibrinogen identifiziert werden. Der relative Flächenanteil der Scanpeaks der Abbauprodukte ist, bezogen auf die Gesamtfläche mit 48,3 % höher als der zur intakten Fibronectin-Bande (440 kd) zugehörige Flächenanteil mit 30,7 %. Bezieht man den prozentualen Anteil des aufgetrennten Fibronectinmaterials auf die mit Hilfe der Laser-Nephelometrie gemessenen Fibronectin-Plasma-Konzentration von 23,0 mg/dl, so entfällt auf das intakte Fibronectin nur 7,6 mg/dl, gegenüber 11,1 mg/dl für die Abbauprodukte.

Die elektrophoretischen Auftrennungen des mit Protaminsulfat aus den Plasmaproben gefällten Fibrin(ogen)materials ist in Abbildung 18 wiedergegeben. Es dominieren während des gesamten Reanimationsverlaufes die Banden mit dem Molekulargewicht 340 kd und 300 kd, die intaktem und leicht abgebautem Fibrinogen entsprechen. Zu Beginn der Reanimation tritt zusätzlich eine Bande mit dem Molekulargewicht 240 kd auf. Diese Bande kann sowohl dem Fibrinogenabbauprodukt X, wie auch dem Fibrinabbauprodukt DY entsprechen. Weiterhin stellt sich im Reanimationsverlauf eine Bande mit dem Molekulargewicht 185 kd dar, die dem Fibrinabbauprodukt DD entspricht. Der relative Anteil dieser Bande an dem gesamten aufgetrennten Material nimmt von 8,6% bei Reanimationsbeginn über 7,9 %

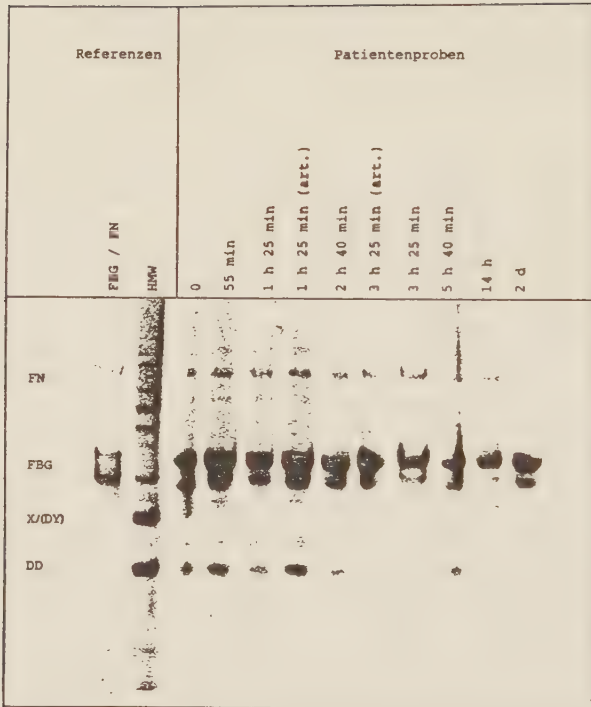


Abb. 18: SDS-PAGE von Fibrin(ogen)material während und nach erfolgreicher Reanimation von Patient 2
FN=Fibronektin, FBG=Fibrinogen

nach 55 Minuten, 4,7 % nach 2 Stunden 40 Minuten auf 1,7 % nach 14 Stunden ab. Diese Anteile wurden mit Hilfe der in Abbildung 19 wiedergegebenen Scans der elektrophoretischen Auftrennungen berechnet. Sie entsprechen dem Flächenanteil unter den jeweiligen Scanpeaks an der Gesamtfläche des Scans. Zwischen diesen relativen DD-Anteilen und den, mittels eines ELISA gemessenen absoluten DD-Werten ergibt sich eine gute Korrelation. Die Fibrinogenabbauprodukte Y (MW 150 kd) und D (MW 100 kd)

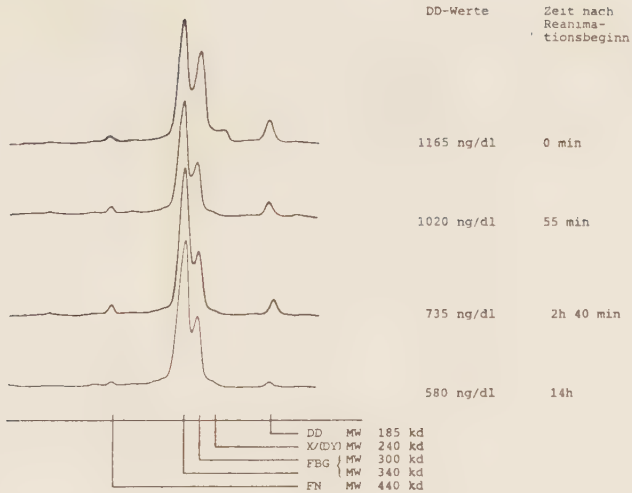


Abb. 19: Scans der SDS-PAGE von Fibrin(ogen)material von Patient 2 während und nach erfolgreicher Reanimation sowie die im Plasma gemessenen DD-Konzentrationen

werden nicht beobachtet. Das Endabbauprodukt E wird wegen seines niedrigen Molekulargewichts von 50 kD mit der vorliegenden Elektrophorese nicht erfaßt.

Im molekularen Bereich über 340 kD kommt es regelmäßig zur Darstellung einer zarten Bande mit einem Molekulargewicht um 440 kD, die mit der Fibronektinreferenz parallel verläuft. Diese Bande kann somit Fibronektin zugeordnet werden. Daneben lassen sich zwei weitere diskrete Banden im hochmolekularen Bereich erkennen.

Die elektrophoretische Auftrennung der Fibrin(ogen)-Kettenuntereinheiten (Abb. 20) läßt neben den ausgeprägten Banden der α -, β - und γ -Ketten quervernetzte γ -Ketten auch mit Hilfe der sehr empfindlichen Silver-Staining Methode nur in sehr geringen Mengen erkennen.

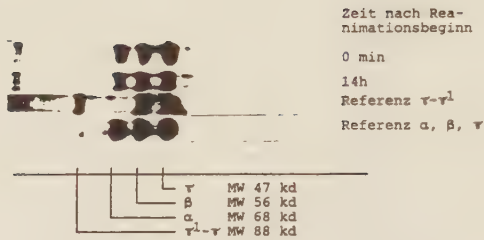


Abb. 20: SDS-PAGE des reduzierten Fibrin(ogen)materials von Patient 2 während und nach erfolgreicher Reanimation

4.1.3. Patient 3

Die Werte für FPA, F-CB3, Fibrinogen, F-CB3/FPA-Quotient sowie die durchgeführten Defibrillationen sind in Tabelle 4 und Abbildung 21 im Verlauf wiedergegeben. Während der 10 minütigen Reanimation steigt das FPA von 65 pmol/ml auf 97 pmol/ml an und fällt nach 24 Stunden auf 12 pmol/ml ab. Die F-CB3 Werte steigen von initial 350 pmol/ml während der Reanimation auf 656 pmol/ml an und fallen schließlich wieder auf 292 pmol/ml ab.

	Zeit nach Reanimationsbeginn				
	0 min	5 min	10 min	25 min	1d
FibrinopeptidA (FPA) (< 5pmol/ml)	65	85	97	57	12
F-CB3 (< 20 pmol/ml)	350	656	392	292	322
Quotient F-CB3/FPA	5,4	7,7	4,0	5,1	26,8
FSP (< 5,0 ug/ml)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Antithrombin (AT III) (22-39 mg/dl)	20,0	18,2	15,3	18,9	23,2
Fibrinogen (FBG) (200-400mg/dl)	390	494	463	689	488
Prothrombin (5-10 mg/dl)	5,4	4,4	4,8	5,5	6,7
Plasminogen (6-25 mg/dl)	6,5	5,9	5,9	7,5	8,6
α_2 -Makroglobulin (150-350mg/dl)	53,2	55,5	56,0	60,6	55,4
Fibronektin (25-50 mg/dl)	18,2	15,8	11,3	23,0	21,9

Normalwerte sind in Klammern angegeben

Tab. 4: Proteinkonzentrationen während und nach erfolgreicher Reanimation von Patient 3 (H.E., geb. 4.12.09)

Entsprechend der höheren molaren F-CB3 Konzentration im Vergleich zu der molaren FPA-Konzentration liegt der F-CB3/FPA Quotient immer über 4. Das Fibrinogen zeigt außerordentlich große Schwankungen. Beim Reanimationsbeginn beträgt die Fibrinogenkonzentration 390 mg/dl. Sie erreicht nach 25 Minuten einen Maximalwert von 689 mg/dl.

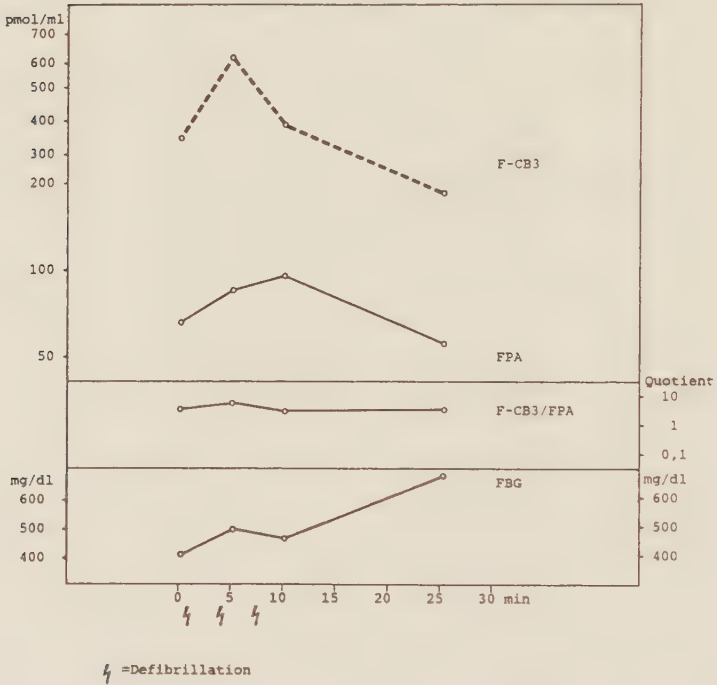


Abb. 21: F-CB3, FPA und Fibrinogen sowie der Quotient der molaren Konzentration F-CB3/FPA während und nach erfolgreicher Reanimation bei Patient 3

Die FSP-Werte sind nicht erhöht und zeigen im Verlauf keine Schwankungen. AT III ist zu Reanimationsbeginn mit 20 mg/dl erniedrigt, erreicht nach 10 minütiger Reanimationsdauer mit 15,3 mg/dl den niedrigsten Wert und steigt nach 24 Stunden wieder auf einen Normalwert von 23,2 mg/dl an.

Prothrombin und Plasminogen bewegen sich mit kleinen Schwankungen im unteren Normalbereich. α 2-Makroglobulin ist mit Werten um 55 mg/dl im gesamten Verlauf deutlich erniedrigt. Die Fibronektinkonzentration ist bei Reanimationsbeginn mit 18,5 mg/dl erniedrigt, fällt während der Reanimation bis auf 11,3 mg/dl ab, liegt aber 15 Minuten später mit 23,0 mg/dl wieder im Normalbereich.

4.1.4. Patient 4

Die Befunde des Patienten 4, der nicht erfolgreich reanimiert wurde, sind in Tabelle 5 und Abbildung 22 zusammengefaßt. Bei diesem Patienten steigt das FPA während der 45-minütigen Reanimationsdauer von 43 pmol/ml bis auf 1280 pmol/ml an. Die AT III Spiegel sind bereits initial mit 17,5 mg/dl erniedrigt und fallen im weiteren Reanimationsverlauf unter 10 mg/dl ab.

	Zeit nach Reanimationsbeginn					
	0 min	10 min	20 min	30 min	35 min	45 min
Fibrinopeptida (FPA) (< 5 pmol/ml)	43	161	177	500	395	1280
F-CB3 (< 20 pmol/ml)	64	120	134	320	189	271
Quotient F-CB3 / FPA	1,5	0,7	0,7	0,6	0,5	0,2
FSP (< 5,0 µg/ml)	1,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Antithrombin (AT III) (22-39 mg/dl)	17,5	15,6	11,9	9,4	9,4	10,9
Fibrinogen (FBG) (200-400mg/dl)	475	418	332	372	273	304
Prothrombin (5-10 mg/dl)	6,9	7,7	5,6	6,2	4,7	4,7
Plasminogen (6-25 mg/dl)	11,8	20,6	9,3	9,2	7,0	6,5
α ₂ -Makro- globulin (150-350mg/dl)	87,3	111,9	82,3	80,8	80,1	60,6
Fibronektin (25-40 mg/dl)	50,0	20,2	28,2	36,1	19,4	23,5

Normalwerte sind in Klammern angegeben

Tab. 5: Proteinkonzentrationen während nicht erfolgreicher Reanimation von Patient 4 (F.A. geb. 24.8.09)

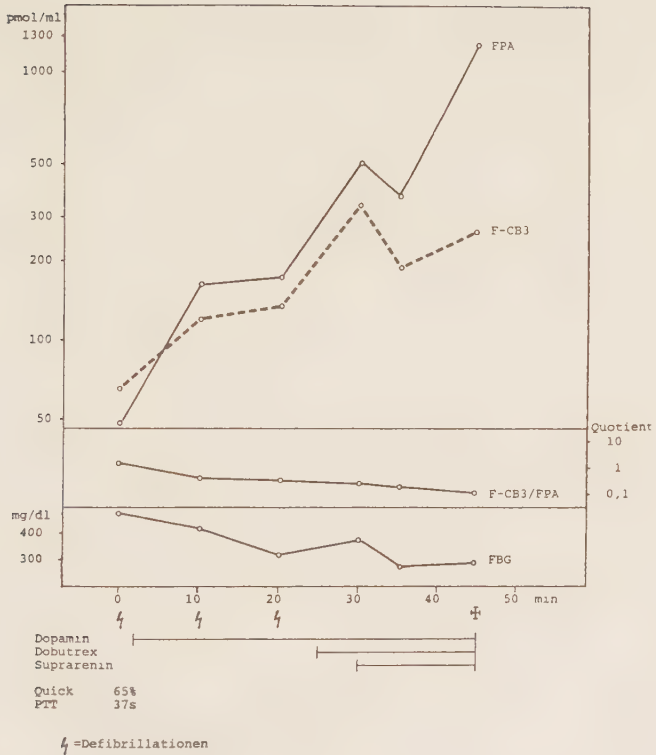


Abb. 22: F-CB3, FPA und Fibrinogen sowie der Quotient der molaren Konzentration F-CB3/FPA während nicht erfolgreicher Reanimation bei Patient 4

Die F-CB3-Werte sind zu Beginn der Reanimation mit 64 pmol/ml nur leicht erhöht, steigen nach 30 Minuten auf 320 pmol/ml an und fallen auf 271 pmol/ml kurz vor Reanimationsende wieder ab. Zu beobachtende phasenhafte Anstiege des FPA und F-CB3 korrelieren zeitlich sowohl mit Defibrillationen als auch mit der Gabe von Katecholaminen (Abb. 22). Als Ausdruck

der gegenüber dem F-CB3 schneller ansteigenden molaren FPA-Konzentration fällt der F-CB3/FPA Quotient bereits kurz nach Reanimationsbeginn von 1,5 unter 1 ab. Bei Beendigung der Reanimation beträgt er nur noch 0,2.

Der Fibrinogenspiegel fällt im Verlauf der Reanimation kontinuierlich von 475 mg/dl auf 304 mg/dl ab. Prothrombin und Plasminogen fallen im Reanimationsverlauf bis in den unteren Normalbereich ab. 2-Makroglobulin ist mit Werten um 80 mg/dl im gesamten Verlauf erniedrigt. Die Fibronektinkonzentration zeigt im Verlauf starke Schwankungen. Sie ist initial mit 50 mg/dl erhöht. Am Ende der Reanimation werden nur noch 23,5 mg/dl gemessen.

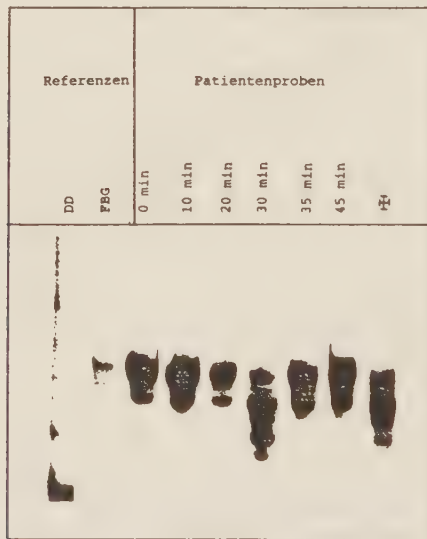


Abb. 23: SDS-PAGE von Fibrin(ogen)material von Patient 4 während nicht erfolgreicher Reanimation. FBG=Fibrinogen

Die Auftrennungen des mittels Protaminsulfat gefällten Fibrin(ogen)materials sind in Abbildung 23 wiedergegeben. Sie zeigen eine im Reanimationsverlauf an Intensität zuerst abnehmende und dann nach 30 Minuten

wieder zunehmende Fibrinogenbande 340 kd. 30 Minuten nach Reanimationsbeginn lassen sich zusätzlich die Banden 300 kd (leicht abgebautes Fibrinogen), 280 kd (prae-X) sowie 240 kd (X)/(DY) nachweisen. DD kommt nicht zur Darstellung. Im molekularen Bereich über 340 kd findet sich die Fibronectinbande (440 kd).

4.1.5. Patient 5

Die Befunde dieses ebenfalls erfolglos reanimierten Patienten sind in Tabelle 6 und Abbildung 15 dargestellt. Während der 15 minütigen erfolglosen Reanimation steigt das FPA von 104 pmol/ml auf 216 pmol/ml und das F-CB3 von 146 pmol/ml auf 194 pmol/ml an. Im Verlauf der Reanimation kommt es zu einem Überwiegen der molaren Konzentration von FPA gegenüber der von F-CB3. Dadurch wird der F-CB3/FPA Quotient kleiner als 1. AT III fällt von 26 mg/dl auf 21 mg/dl, Fibrinogen von 460 mg/ml auf 375 mg/dl ab. Die Änderungen der Prothrombin- und Plasminogenkonzentrationen sind

	Zeit n. Reanimationsbeginn		
	0 min	5 min	15 min
FibrinopeptidA (FPA) (< 5 pmol/ml)	104	128	216
F-CB3 (< 20 pmol/ml)	146	108	194
Quotient F-CB3 / FPA	1,4	0,8	0,9
FSP ($< 5,0$ ug/ml)	3,0	3,0	3,0
Antithrombin (AT III) (22-39 mg/dl)	26,0	20,0	21,0
Fibrinogen (FBG) (200-400mg/dl)	460	420	375
Prothrombin (5-10 mg/dl)	8,3	6,7	7,0
Plasminogen (6-25 mg/dl)	12,0	10,0	10,0
α_2 -Makro-globulin (150-350mg/dl)	87,3	111,9	82,3
Fibronektin (25-40 mg/dl)	50,0	44,2	41,2

Normalwerte sind in Klammern angegeben

Tab. 6: Proteinkonzentrationen während nicht erfolgreicher Reanimation von Patient 5 (R.K., geb. 16.03.08)

geringfügig. $\alpha 2$ -Makroglobulin ist im gesamten Verlauf mit 85 mg/dl erniedrigt. Die Fibronektinwerte sind mit 50,0 mg/dl bei Reanimationsbeginn und mit 41,3 mg/dl bei Reanimationsende erhöht.

4 Stunden vor der Reanimation betrug der Quick-Wert 85%, die PTT 25 Sekunden und die Thrombozytenzahl 224.000/ml. Während der Reanimation sinkt der Quick-Wert auf 23%, die PTT steigt auf über 180 Sekunden an und die Thrombozyten fallen auf 189.000/ml ab.

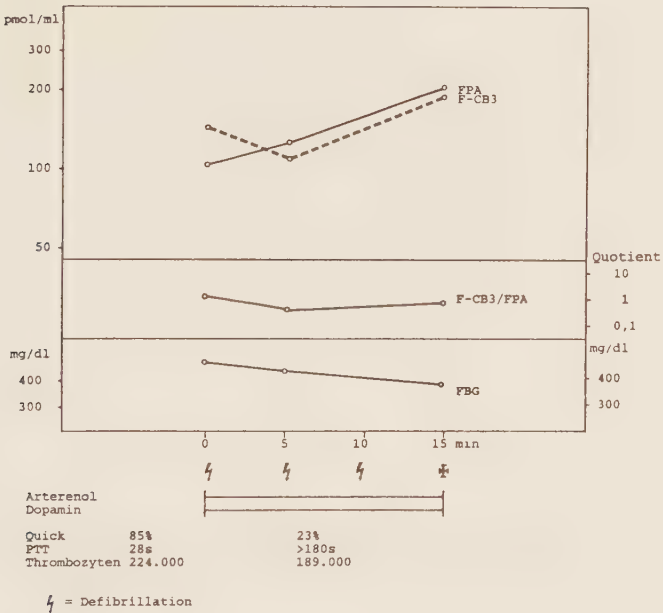


Abb. 24: F-CB3, FPA und Fibrinogen sowie der Quotient der molaren Konzentration F-CB3/FPA während nicht erfolgreicher Reanimation von Patient 5

4.1.6. Patient 6

Die Befunde für Patient 6, der erfolglos reanimiert wurde, sind in Tabelle 7 und Abbildung 25 wiedergegeben.

	Zeit n. Reanimationsbeginn		
	0 min	5 min	15 min
Fibrinopeptida (FPA) (< 5 pmol/ml)	244	496	612
F-CB3 (< 20 pmol/ml)	58	84	110
Quotient F-CB3 / FPA	0,23	0,16	0,17

Normalwerte sind in Klammern angegeben

Tab. 7: Proteinkonzentrationen während nicht erfolgreicher Reanimation von Patient 6 (B.M., geb. 9.9.08)

Bei diesem Patienten steigen sowohl die FPA-Werte wie auch die F-CB3-Werte während der Reanimation an. Dabei sind die FPA-Werte mit 244 pmol/ml in ihrer molaren Konzentration wesentlich höher als die von F-CB3 mit 58 pmol/ml bis 110 pmol/ml. Der Quotient F-CB3/FPA ist dementsprechend immer deutlich kleiner als 1. Der Godal ist während der Reanimation dreifach positiv.

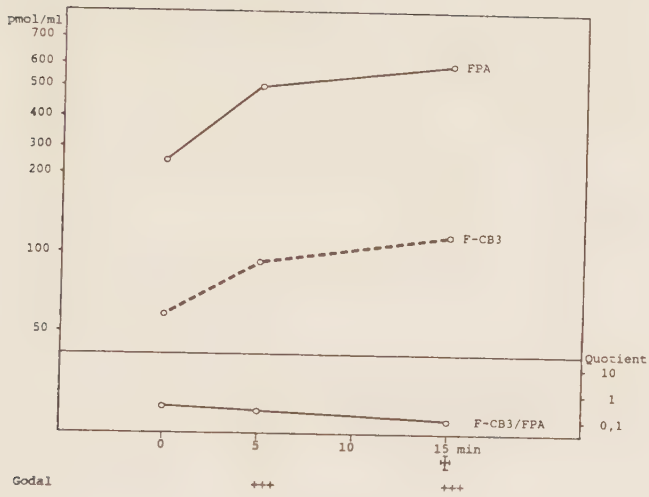


Abb. 25: F-CB3 und FPA sowie der Quotient der molaren Konzentration F-CB3/FPA während nicht erfolgreicher Reanimation von Patient 6

4.2. Ergebniszusammenfassung

In Abbildung 26 sind die FPA-Werte wiedergegeben, die am Beginn und am Ende jeder Reanimation gemessen wurden. Dabei zeigt sich, daß es bei den drei erfolgreich reanimierten Patienten zu einem FPA-Abfall, bei den drei erfolglos reanimierten Patienten zu einem kontinuierlichen FPA-Anstieg kommt. Am Ende der Reanimation liegen die FPA-Werte bei allen erfolgreich reanimierten Patienten deutlich niedriger als bei den erfolglos reanimierten Patienten.

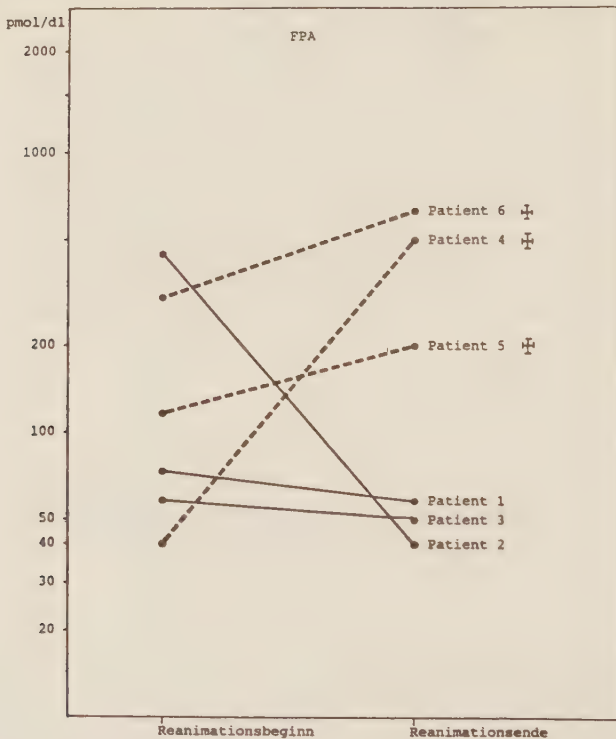


Abb. 26: Verlauf der FPA-Werte bei ●—● erfolgreichen und ●---● nicht erfolgreichen Reanimationen

Die F-CB3 Ausgangswerte liegen bei allen erfolgreich reanimierten Patienten höher als bei den erfolglos reanimierten. Während der Reanimation kommt es bei den erfolgreich reanimierten Patienten zu einem Abfall, bei den erfolglos reanimierten Patienten zu einem Anstieg der F-CB3-Werte.

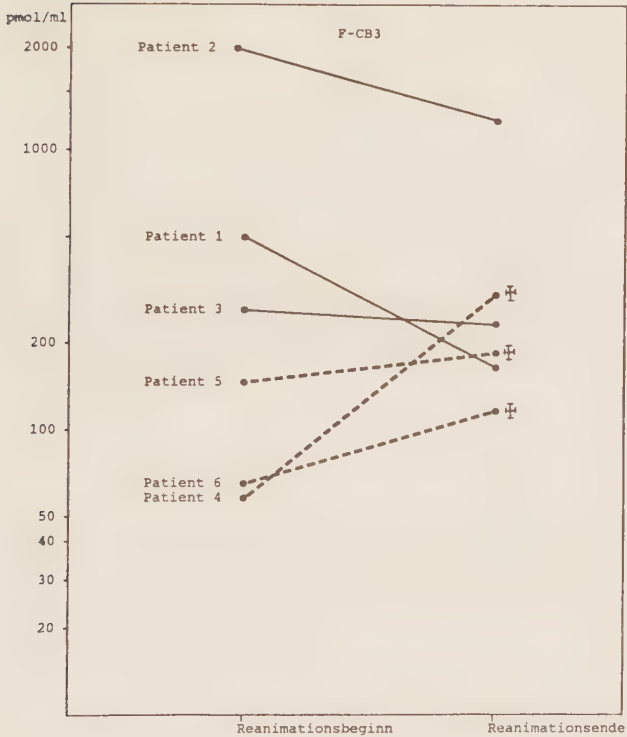


Abb. 27: Verlauf der F-CB3-Werte bei erfolgreichen ●—● und nicht erfolgreichen ●---● Reanimationen

Der Quotient der molaren Konzentrationen von F-CB3/FPA (Abb. 28) ist bei den erfolgreich reanimierten Patienten immer größer als 1, bei den erfolglos reanimierten Patienten fällt er während der Reanimation immer unter 1 ab.

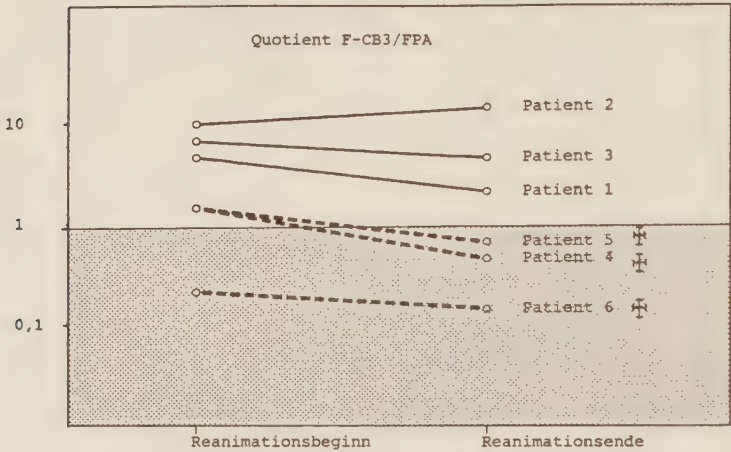


Abb. 28: Quotient der molaren Konzentration von F-CB3/FPA zu Beginn und am Ende bei ●—● erfolgreichen und ●---● nicht erfolgreichen Reanimationen.

5. Diskussion

Die bei allen Reanimationen zu beobachtenden hohen FPA-Werte belegen eine erhebliche Aktivierung der Gerinnung, wie sie auch Crowell bei tierexperimentellen Beobachtungen anhand von veränderten Blutungszeiten beschrieb (6). Die sehr hohen Werte sind möglicherweise zum Teil mit zurückzuführen auf die verminderte renale Ausscheidung während der Reanimation.

Die im Reanimationsverlauf ansteigenden FPA-Werte korrelieren mit einer ungünstigen, die abfallenden FPA-Werte mit einer günstigen Prognose (Abb. 17). Dabei können die ansteigenden FPA-Werte ein Hinweis darauf sein, daß die im Rahmen der mechanischen Herzmassage erreichte Zirkulation unzureichend ist. Auf jeden Fall gelingt es bei diesen Patienten nicht, durch die Reanimation die Aktivierung von Thrombin durch Stase, Hypoxie und Endothelschädigung zu verhindern.

Einer AT III Erniedrigung kommt hinsichtlich des Reanimationserfolges keine entscheidende prognostische Bedeutung zu. Sie wurde bei zwei Patienten beobachtet, von denen einer erfolgreich reanimiert wurde.

Die bereits initial nachweisbaren hohen F-CB3 Spiegel bei den erfolgreich reanimierten Patienten zeigen, daß die Fibrin(ogen)olyse schon vor der Reanimation stimuliert wird (Abb. 18). Diese Beobachtung wird auch durch die elektrophoretischen Befunde belegt. Eine besonders ausgeprägte Fibrin(ogen)olyse läßt sich bei einem Patienten nachweisen, bei dem initial das gesamte Fibrinogen durch den Abbau der A α -Kette zum Fibrinogenbruchstück X umgewandelt ist (Abb. 3). Die parallel dazu auftretenden sehr hohen F-CB3 Werte spiegeln den hohen Anfall von abgespaltenen α -Kettenbruchstücken wieder. Die im Molekül verbliebenen α -Kettenreste, die in den reduzierten Elektrophoresen durch die α 1- und α 2-Kettenbruchstücke repräsentiert werden, sind dementsprechend initial ausgeprägt und nehmen im weiteren Verlauf parallel zu den F-CB3 Werten ab. Diese Befunde belegen somit eine quantitativ ausgeprägte Fibrin(ogen)olyse, die aber bezogen auf den Fibrinogenabbau sehr limitiert ist. Da das frühe Fibrinogenolyseprodukt X überwiegend noch gerinnbar ist, führt diese Fibrinogenolyse zu keinem wesentlichen Abfall der gemessenen

Fibrinogenkonzentration. Da die weiter abgebauten Fibrinogenbruchstücke Y, D und E nicht auftreten, zeigt der Staphylokokken-Clumping-Test keine pathologische Verklumpungsreaktion. Somit läßt sich die günstige Prognose der früh einsetzenden intensiven Fibrin(ogen)olyse nur anhand der F-CB3-Werte und der Elektrophorese belegen. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß eine erhöhte Fibrinolyse auch beim protrahierten Schock mit einer besseren Prognose korreliert (39, 43, 49).

Die bei den erfolglos reanimierten Patienten initial vergleichsweise niedrigen F-CB3 Werte, die erst im Verlauf der Reanimation ansteigen, zeigen, daß es bei diesen Patienten erst während der Reanimation zu einer stärkeren Stimulation der Fibrin(ogen)olyse kommt. Dies wird auch in der elektrophoretischen Auftrennung durch die, erst im Reanimationsverlauf auftretenden Anteile früher Fibrinogenolyseprodukte erkennbar.

Der Nachweis der sehr limitierten Fibrinolyse zeigt, daß es in der kurzen akuten Reanimationsphase zu keiner Erschöpfung des Gerinnungs- und Fibrinolyseinhibitorpotentials kommt. Darauf deuten auch die weitgehend normalen AT III Werte hin. Insofern unterscheidet sich das Haemostasesystem der akuten Reanimationssituation von der disseminierten intravasalen Gerinnung des protrahierten Schocks (39).

In Anbetracht der erheblichen Gerinnungsaktivierung während der Reanimationsphase ist der geringe Nachweis quervernetzten Fibrinmaterials überraschend. Dies legt nahe, daß Fibrinmaterial in der Zirkulation abgelagert wird. In den Lungen- und Nierenkapillaren von erfolglos reanimierten Patienten konnten fibrinhaltige Mikrothromben nachgewiesen werden (22). Bei Patienten, die an vergleichbaren Krankheiten starben, jedoch nicht reanimiert wurden, waren solche Mikrothromben nicht zu beobachten (22). Ebenso konnten bei Patienten, die eine Reanimation längere Zeit überlebt hatten keine Ablagerungen festgestellt werden (45). Dies spricht für den Einfluß der Herzmassage auf die Ablagerung von Fibrinmaterial in den Kapillaren. Dabei kann nicht entschieden werden, ob es während der Herzmassage direkt im Bereich der Mikrozirkulation zur Fibrinablagerung kommt oder, ob in der Zirkulation gebildetes Fibrinmaterial im Rahmen der Minimalzirkulation im Kapillarfilter aufgefangen wird. Auf jeden Fall begünstigt eine Verschiebung im Hämostasesystem die

Bildung von Thromben in der Mikrozirkulation.

Das Verhältnis von Gerinnung und Fibrinolyse zueinander entscheidet letztlich über die Menge zirkulierenden oder abgelagerten Fibrins. Dieses Gleichgewicht wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Quotienten der molaren Konzentration von F-CB3 zu FPA erfaßt. Dieser zeigt, daß bei allen erfolglos reanimierten Patienten immer ein Überwiegen der Gerinnung vorlag, während bei allen erfolgreich reanimierten Patienten immer die Fibrinolyse der Gerinnung überwog. Diese Befunde zeigen den günstigen Einfluß einer Verschiebung im Hämostasesystem zugunsten der Fibrinogenolyse während der kardiopulmonalen Reanimation.

Die auffallende Korrelation von steilen FPA und F-CB3 Anstiegen bei der Gabe von Katecholaminen weist auf die Fähigkeit der Katecholamine hin, sowohl die Gerinnung und als auch die Fibrinolyse zu aktivieren (9, 50, 55, 61). Bei Elektroschockbehandlungen konnte die Aktivierung des fibrinolytischen Systems über die Freisetzung von Plasminaktivatoren und die Aktivierung des Koagulationssystems über eine endogene Freisetzung von Katecholaminen beobachtet werden (8). Die bei der Elektrokardioversion zu beobachtende Aktivierung der Koagulation und Fibrinolyse ist vermutlich auf ähnliche Effekte zurückzuführen.

Die mit dem Laser-Nephelometer gemessenen Fibronektinkonzentrationen während der Reanimation zeigen ein uncharakteristisches Verhalten. Dieses ist, zumindest teilweise, auf die elektrophoretisch nachgewiesenen Fibronektinspaltprodukte zurückzuführen. Durch die Verwendung des gleichen Antikörpers, sowohl in der Laser-Nephelometrie, als auch zur Iso-lation des Fibronektinmaterials zur elektrophoretischen Auftrennung kann davon ausgegangen werden, daß diese Produkte von der Laser-Nephelometrie miterfaßt werden. Berücksichtigt man die relativen Anteile von intaktem Fibronektin und seiner Abbauprodukte im Plasma, so zeigt sich, daß deren Verhältnis zu Beginn und 9 Stunden nach der Reanimation identisch ist. Mit der Laser-Nephelometrie gemessene normale oder erhöhte Fibronektinkonzentrationen geben deshalb beim Vorliegen höherer fibrinolytischer Aktivität keine zuverlässige Informationen darüber, inwieweit insbesondere die für das RES opsonierende Funktion des Fibronektins tatsächlich verfügbar ist.

6. Zusammenfassung

Bei 6 Patienten wurden während der Reanimation Blutproben zur Bestimmung von Koagulations- und Fibrinolysewerten entnommen. Drei erfolgreich reanimierte Patienten wurden auch in der Postreanimationsphase beobachtet.

Zu Reanimationsbeginn lag bei allen Patienten das FPA, als Ausdruck gesteigerter Gerinnungsaktivierung, bei erhöhten Werten zwischen 40 und 500 pmol/ml. Bei den drei erfolgreich reanimierten Patienten fielen die initial hohen Werte noch während der Reanimation ab, während bei den erfolglos reanimierten Patienten die FPA-Werte während der Reanimation auf noch höhere Werte anstiegen.

Das F-CB3, als frühes α -Kettenbruchstück Zeichen der Fibrin(ogen)olyse, war bei den erfolgreich reanimierten Patienten schon initial stark erhöht und fiel im Verlauf ab. Bei den erfolglos reanimierten Patienten jedoch waren die Ausgangswerte niedriger und erreichten trotz eines Anstieges nicht die hohen Ausgangswerte der erfolgreich reanimierten Patienten.

Die elektrophoretische Auftrennung des Fibrin(ogen)materials zeigte trotz der starken Gerinnungsaktivierung nur geringste Mengen an quervernetztem Fibrinmaterial. Auch konnte wenig DD, das Abbauprodukt der Fibrinolyse, nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die Elektrophorese Abbauprodukte der Fibrinogenolyse. In Einklang mit den hohen F-CB3 Werten und den normalen FSP Werten deuten die elektrophoretischen Befunde auf eine intensive, aber auf den Abbau des Fibrinogens limitierte, Fibrinogenolyse hin.

Ein Verbrauch der Gerinnungsfaktoren Prothrombin und Plasminogen konnte bei keinem Patienten beobachtet werden, lediglich das AT III war bei zwei Patienten geringfügig erniedrigt.

Es konnte die Aktivierung sowohl des Koagulations- als auch des Fibrinolyseystems aufgrund von Katecholamingaben sowie von Defibrillationen beobachtet werden.

Das Verhältnis von Koagulation zu Fibrinolyse wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Quotienten der molaren Konzentration von F-CB3 zu FPA beschrieben. Beim Vergleich der erfolgreich reanimierten Patienten mit den erfolglos reanimierten Patienten ergibt sich für die erfolgreich reanimierten Patienten stets ein Quotient größer als 1. Dies könnte Ausdruck eines prognostisch günstig zu beurteilenden Überwiegens der Fibrinolyse über die Gerinnung sein.

Die Bestimmung der Fibronektin-Werte erbrachte bei den einzelnen Patienten teilweise erhebliche Schwankungen. Die elektrophoretische Auftrennung des Fibronektinmaterials zeigte neben intaktem Fibronektin auch Fibronektin-Abbauprodukte, die vermutlich nur teilweise bei der Messung der Absolutwerte miterfaßt wurden und Ursache der Schwankungen sind. Da die mit der Laser-Nephelometrie miterfaßten Abbauprodukte vermutlich nicht die gleiche biologische Aktivität hinsichtlich der opsonierenden Funktion des Fibronektins haben, erscheint die Beurteilung der opsonierenden Aktivität des Fibronektins aufgrund von Laser-Nephelometrie-Messungen des Plasma-Spiegels fraglich.

7. Literatur

1. Alkjaersig, N., Fletcher, A.P.; Catabolism and Excretion of Fibrinopeptide A. Blood, Vol. 60, No 1, 1982, 148-156
2. Biadala, E.; Mouth to Mouth Resuscitation and Electric Stimulation of Cardiac Action described 200 years ago. Wiad. Lek. 35, 1981, 1471 - 1477
3. Bick, R.L; Clinical relevance of Antithrombin III. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 8, 1982, 267 - 287
4. Blombäck B., Yamashina, I.; On the N-terminal Amino Acids in Fibrinogen and Fibrin. Arkiv Kemi 12, 1958, 299 - 307
5. Blumenstock, F., Weber, P., Saba, Th.M.; Isolation and Biochemical Characterisation of alpha-2-Opsonic Glycoprotein from Rat Serum. J. Biol. Chem. 252, 1977, 7156 - 7162
6. Crowell, J. W., Sharpe, G. P., Lambright, R. L., Read, W. L.; The Mechanism of Death after Resuscitation following Acute Circulatory Failure. Surgery 38, 4 , 1955, 696 - 702
7. Doolittle, R.F.; Fibrinogen: Hauptakteur bei der Blutgerinnung, Spektrum der Wissenschaft 136, 1982, 58 - 74
8. Fantl, P., Simon, S. E.; Fibrinolysis following electrically induced convulsions. Austr. J, Exper. Med. Science, 26, 1948, 521 - 529
9. Fracasso, J.F., Rothschild, A.M.; Contribution of Adrenaline to the Fibrinolytic Activity Evoked by E.Coli Endotoxin in the Rat. Thromb Haemostas (Stuttgart) 50 (2), 1983, 557 - 559
10. Francis, C.W., Marder, V.J.; A molecular model of plasminic degradation of crosslinked Fibrin. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 8, 1982, 25 - 35
11. Gaffney, P.J.; The Occurrence and Clinical Relevance of Fibrin Fragments in Blood. Annals New York Academy of Sciences, 0077-8923, 1983, 407-423
12. Gaffney, P.J.; The lysis of cross-linked Fibrinogen by Plasmin yields initially a single molecular Complex, D-Dimer-E. Thrombosis Research 15, 1979, 673 - 687
13. Gerdin, B., Saldeen, T.; Deposition and Clearance of Fibrin in the Rat Lung Following Acute Haemorrhage. Circulatory Shock 6, 1979, 357 - 364
14. Gollwitzer R., Hafter R., Timpl R., Graeff H.; Immunological assay for a Carboxyterminal peptide of the fibrinogen α -chain in normal and pathological human sera. Thrombos. Research 11, 1977, 859 - 868

15. Gollwitzer, R., Henschen, A., Hessel, B.; Antigene Determinanten in F-CB3, einem großen BrCN-Peptid der A α -Kette des humanen Fibrinogens. Fibrinogen, Fibrin und Fibrinkleber. In: Schimpf, K. (ed.), Verhandlungsbericht der DAB über die 23. Tagung 1979, Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, 1979, 39 - 42
16. Graeff, H., Hafter, R., Bachmann, L.; Subunits and macromolecular structure of circulating fibrin from obstretical patients with intravascular coagulation. Thrombosis Res. 16, 1979, 313 - 328
17. Graeff, H., Hafter R.; Detection and relevance of crosslinked fibrin derivatives in blood. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 8, 1982, 57 - 68
18. Graeff, H., v. Hugo, R., Hafter, R.; In vivo formation of soluble fibrin monomer complexes in human plasma, Thromb. Res. 3, 1977, 465
19. Gräner, W.; Zur "Quantitativen Bestimmung von Immunglobulinen durch photometrische Trübungsmessung". Leserbrief. GIT Labor-Medizin 5, 1985, 320 - 321
20. Hafter, R., Graeff, H.; Estimation of soluble fibrin monomer complexes by agarose gel filtration. In: Progress in Chemical Fibrinolysis Vol. 2, J.F. Davidson, M.M. Samama, Desnoyers, Raven Press, New York, 1976, 137 - 149
21. Hafter, R., Schröck, R., von Hugo, R., Graeff H.; Clinical aspects of Fibrin Formation and Fibrinolysis measured with Monoclonal Antibodies against DD. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Vol. 45, Suppl. 178, 1985, 137 - 141
22. Hartveit, F., Halleraker, B.; Intravascular Changes in Kidneys and Lungs after External Cardiac Massage: A Preliminary Report. J. Path. 102, 1970, 54 - 58
23. Hauck; Physiologische Aspekte der Haemorheologie, Haemostaseologie 4, 1984, 9
24. Hawiger, J.; Measurement of Fibrinogen and FDP in serum by staphylococcal clumping test. J. Lab. Clin. Med., 1970, 234
25. Heene, D.L., Lasch, H.G.; Klinische Aspekte der Mikrozykulationsstörungen unter besonderer Berücksichtigung des Schocks. in: Handbuch der allgemeinen Pathologie Bd.III/7, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 889 - 895
26. Heidelberger, M., Kendall, F.E., J.Exptl. Med. 55, 1932, 555
27. Heidelberger, M., Kendall, F.E., J.Exptl. Med. 62, 1935, 697
28. Heidelberger, M., Kendall, F.E., J.Exptl. Med. 64, 1936, 161

29. Henschen, A.; On the Structure of Functional Sites in Fibrinogen. Thromosis Research, Suppl. V, 1983, 27 - 39
30. Henschen, A.; Number and reactivity of disulfide bonds in fibrinogen and fibrin. Arkiv Kemi 22, 1964, 355
31. Henschen, A.; Fibrinogen - Blutgerinnungsfaktor I, Haemostaseologie 1, 1981, 3 - 23
32. Henschen, A., Lottspeich, F., Hessel B.; Amino Acid sequence of human fibrin. Preliminary note on the completion of intermediate part of the α -chain sequence. In Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1976, 195
33. Hörmann, H., Gollwitzer, R.; Analytische Untersuchungen über Rinderfibrinogen und -fibrin, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 346 1966, 21 - 41
34. Hörmann H.; Fibronektin (Kälte-unlösliches Globulin). Ein Haftfaktor für Zellen und seine Steuerung. Haemostaseologie 2, 1982, 3 - 23
35. Hughes, J.T.; Miraculous deliverance of Anne Green: An Oxford case of resuscitation in the seventeenth century. Br. Med. J. 285 (6357), 1982, 1792 - 1793
36. Kockum, C., Frebelius, S.; RID Radioimmunoassay of Human Fibrinopeptide A - Removal of Cross-Reacting Fibrinogen with Bentonite. Thrombosis Research 19, 1980, 589 - 598
37. Kaplan, J.E., Saba, Th.M., Cho, E.; Serologic Modification of Reticulo-endothelial Capacity and Altered Resistance to Traumatic Shock. Circulatory Shock 3, 1976, 203 - 210
38. Kouwenhoven, W.B., Jude, J.R.; Knickerbocker, G.G. Closed-Chest cardiac massage. JAMA 173, 1960, 1064
39. Lasch, H.G., Oehler, G., Disseminated Intravascular Coagulation. in: J. van de Loo, C.R. Prentis, F.K. Bela (eds.); Schattauer, Stuttgart - New-York, 1983, 413 - 433
40. Lindner, K.H., Ahnefeld, F.W.; Kardiopulmonale Reanimation durch externe Herzmassage: frühzeitiger Einsatz entscheidend. Klinikarzt 13, 1984, 152
41. Marder, V.J., Budzynski, A.Z., James, H.L.; High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. III. Their NH₂-terminal amino acids and comparison with the NH₂-terminal disulfid knot. J. Biol. Chem. 247, 1972, 4775
42. Marder, V.J., Francis, C.W.; Plasmin Degradation of Cross-Linked Fibrin. Annals New York Academy of Science 0077-8923, 1983, 397-406

43. Matthias, F.R., Lasch, H.G.; Disseminierte intravasale Gerinnung und Kreislaufchock. Hämostaseologie, 2, 1982, 26/60 - 40/67
44. McKay, D.G., Linder, M.M., Cruse, V.K.; Mechanism of Thrombosis of the Microcirculation. Am. J. Path. 63, 2, 1971, 231 - 241
45. Mehta, B., Briggs, D.K., Sommers, S.C., Karparkin, M., Cardiac Arrest. Disseminated Intravascular Coagulation. Coagulation Abnormalities, A Study of 15 Patients. The American Journal of the Medical Sciences, Vol. 264, Nr. 5, 1972, 353 - 363
46. Negovsky, N.; Reanimatology today. Crit. Care Med. 10, 1982, 654 - 656
47. Nossel, H.L., Butler jr., V.P., Canfield, R.E., Yudelmann, I., Ti, M., Spanondis, K., Soland, T.; Potential Use of Fibrinopeptide A Measurements in the Diagnosis and Management of Thrombosis. Thrombosis. Diathesis. haemorrh. (Stuttg.) 33, 1975, 426-434
48. Nossel, H.L., Yudelmann, I., Canfield, R.E., Butler, Jr., V.P., Spanondis, K., Wilner, G.D., Qureschi, G.D., Measurement of Fibrinopeptide A in Human Blood. The Journal of Clinical Investigation Vol 54, 1974, 43-53
49. Oehler, G., Lasch, H.G.; Gerinnungsstörungen im Schock. in Riecker (ed.): Handbuch der Inneren Medizin Bd. IX/2, Schock, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984
50. Ogston D.; The Fibrinolytic Enzyme System. In: Ogston, D., The Physiology of Hemostasis, Croom Helm, London, Canberra, 1979, 141 - 193
51. Perman, E.; Successful cardiac resuscitation in the 18th century, Br. Med. J. 2 (6154), 1978, 1770 - 1771
52. Pott, G.; J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 1980, 893
53. Ratnoff, O.D.; Disseminated Intravascular Coagulation. In: Ratnoff, O.D., Forbes, C.D. (eds.) Disorders of Hemostasis, Grune&Stratton, Diego, San Francisco, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, Sao Paulo, 1985, 289-319
54. Riede, U.N., Mittermayr, C., Rohrbach, R., Joh, K., Vogel, W., Fringes, B.; Mikrothrombosierung der Endstrombahn als Ursache schockbedingter Organkomplikationen (unter besonderer Berücksichtigung der Schocklunge). Hämostaseologie 2, 1982, 9/49 - 25/59
55. Rosing, D.R., Redwood, D.R., Brakman, P., Astrup, T., Epstein, S.E.; The Fibrinolytic Response of Man to Vasoactive Drugs measured in Arterial Blood. Thromb. Res. 13, 419 - 428, 1978
56. Saba, Th.M., Jaffe, E.; Plasma Fibronectin (Opsonic Glycoprotein): Its Synthesis by Vascular Endothelial cells and Role in Cardiopulmonary Integrity after Trauma as related to Reticuloendothelial Function. Am. J. Med. 68, 1980, 577 - 594,
57. Saldeen, T.; Vasoactive Peptides Derived from Degradatioof Fibrinogen and Fibrin. Annals New York Academy of Sciences, 0077 - 8923, 1983, 426 - 439

58. Safar, P., Bleyart, A., Nemeto, E.M., Mooser, J.; Resuscitation after global brain ischemia anoxia. Crit. Care Med. 4, 1978, 215
59. Schmitz, E., Franke, N., Peter, K.; Fortschritte in Reanimation und Schockbehandlung. Fortschr. Med. 103, 1985, 287 -289
60. Schroer, K.; Die Rolle des Fibrinogens beim Fließverhalten des Blutes. Hämostaseologie 4, 1984, 22 - 24
61. Sherry, S., Lindemeyer, R.I., Fletcher, A.P., Alkjaersig, N.; Studies on enhanced fibrinolytic activity in man. J. Clin. Invest. 38, 1959, 810 - 822
62. Stachurska, J., Janik, M., Kobus, M., Luczak, M., Szmielski, S., Roszkowski, M., Gerdin, B., Saldeen, T., Kopec, M.; Effects of Peptides cleaved from Human Fibrinogen by Plasmin on Rabbit Kidney Cells in Culture. Thromb. Res. 29, 1983, 419 - 424
63. Sternberg, J.C.; Monitoring the precipitin reaction using rate nephelometry. ICPR, 1984, 16-23
64. Todd; Plasminogen activators. J.Clin Path. 33 , Suppl. 14, 1979, 18 - 23
65. Weber, K., Osborn, M.; The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamid gel electrophoresis J. Biol. Chem. 244, 1969, 4406 - 4412

Herrn Prof. Dr. W. Wilmanns danke ich besonders für die Überlassung des Themas und die zur Verfügungstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. W. Klaubert bin ich zu großem Dank verpflichtet bei der Anleitung für den experimentellen Teil der Arbeit und für die Unterstützung und Anregungen bei der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Dr. Gollwitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, München-Martinsried gilt mein Dank für die Hilfe bei der Bestimmung der F-CB3-Werte.

Lebenslauf

geboren: 22. Februar 1960 in Göttingen
Konfession: evangelisch-lutherisch
Eltern: Prof. Dr. med. Karl-August Bushe, o. Professor für
Neurochirurgie der Universität Würzburg
Eva-Christa Bushe, geb. Neumann-Blindow
Ehefrau: Dr. med. Barbara Bushe, geb. Gaßner
Grundschule: 1966 - 1969 Hölty-Schule, Göttingen
Gymnasium: 1969 - 1975 Neues Gymnasium (neusprachlich),
Göttingen
1975 - 1979 Friedrich-Koenig-Gymnasium (naturwis-
senschaftlicher Zweig), Würzburg
Reifezeugnis am 25. Juni 1979 in Würzburg
Studium: Oktober 1979 - April 1980 1ère Candidature en
médecine (Université Libre de Bruxelles)
ab Mai 1980 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1982 Ärztliche Vorprüfung
März 1983 1. Abschnitt Staatsexamen
März 1985 2. Abschnitt Staatsexamen
Mai 1986 3. Abschnitt Staatsexamen
Approbation: 27. Mai 1986

